

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 8 月 14 日 (14.08.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/066863 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/53,
9/02, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21, C12P 7/40

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01240

(22) 国際出願日: 2003 年 2 月 6 日 (06.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-30127 2002 年 2 月 6 日 (06.02.2002) JP
特願2002-281236 2002 年 9 月 26 日 (26.09.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K.K.) [JP/JP]; 〒105-8518 東京都港区芝大門 1 丁目 1 番 9 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蒲池 晴美 (KAMACHI, Harumi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台 1 丁目 1 番 1 号 昭和電工株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP). 江崎 信芳 (ESAKI, Nobuyoshi) [JP/JP]; 〒520-2279 滋賀県大津市黒津二丁目 2 1 番の 1 2 Shiga (JP). 栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo) [JP/JP]; 〒612-8104 京都府京都市伏見区西奉行町伏見合同宿舎 5 3 3 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 大家 邦久 (OHIE, Kunitisa); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 2 丁目 2 番 6 号 堀口第 2 ビル 7 階 大家特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: α -SUBSTITUTED- α , β -UNSATURATED CARBONYL COMPOUND REDUCTASE GENE

WO 03/066863 A1

(54) 発明の名称: α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子

(57) Abstract: A reductase gene of an α -substituted- α , β -unsaturated carbonyl compound which contains a DNA sequence encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:20 and the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:21; an enzyme which is the product of the gene; a plasmid and a transformant containing the gene DNA; and a method of reducing an α -substituted- α , β -unsaturated carbonyl compound using the transformant. Thus, it is intended to provide an enzyme gene which is useful in hydrogenating the carbon-carbon double bond in an α -substituted carbonyl compound having an α , β -carbon-carbon double bond, which is a compound prochiral at the α -position, to give the corresponding α -substituted- α , β -saturated carbonyl compound optically active at the α -position, and an enzyme which is the gene product.

[続表有]



(57) 要約:

配列番号 20 で示されるアミノ酸配列及び配列番号 21 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含む α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子、その産物である酵素、その遺伝子 DNA を含むプラスミド、形質転換体及びその形質転換体を用いた α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元方法に関する。

本発明によれば、 α 位についてプロキラルな分子である α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の炭素・炭素二重結合に水素添加して、対応する α 位について光学活性な α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物を生産するのに有用な酵素遺伝子およびその産物としての酵素が提供される。

明細書

α - 置換 - α , β - 不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子

5 技術分野

- 本発明は α - 置換 - α , β - 不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子およびその産物である酵素に関する。さらに詳しく言えば、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アクチノマイセス (*Actinomyces*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、エアロモナス (*Aeromonas*) 属、アルカリジェネス (*Alcaligenes*) 属、アースロバクター (*Arthrobacter*) 属、アゾトバクター (*Azotobacter*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、エンテロバクター (*Enterobacter*) 属、エンテロコッカス (*Enterococcus*) 属、エッシェリッシア (*Escherichia*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属、ハロバクテリウム (*Halobacterium*) 属、ハロコッカス (*Halococcus*) 属、クレブシラ (*Klebsiella*) 属、ラクトバシラス (*Lactobacillus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、ミクロコッカス (*Micrococcus*) 属、ミクロポリスポラ (*Micropolyspora*) 属、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属、ノカルディア (*Nocardia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュードノカルディア (*Pseudonocardia*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属およびキサントモナス (*Xanthomonas*) 属からなる群より選ばれる 1 種以上の微生物に由来することを特徴とする、 α , β - 炭素・炭素二重結合を有する α - 置換カルボニル

化合物の α 、 β -炭素・炭素二重結合に水素添加して、対応する α -置換- α 、 β -飽和カルボニル化合物を生成する活性を有する α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子およびその産物である酵素に関する。

- 5 さらには、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属またはバークホルデリア (*Burkholderia*) 属微生物、特にシュードモナス・エスピー・SD 8 1 0 株 (*Pseudomonas* sp. SD810)、シュードモナス・エスピー・SD 8 1 1 株 (*Pseudomonas* sp. SD811)、シュードモナス・エスピー・SD 8 1 2 株 (*Pseudomonas* sp. SD812) およびバークホルデリア・エスピー・SD 8 1 6 株 (*Burkholderia* sp. SD816) に由来する上記活性を有する α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子およびその産物である酵素に関する。

- 15 また、本発明は、 α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物は α 位についてプロキラルな分子であるが、この炭素・炭素二重結合に立体選択的に水素添加して、対応する α 位について光学活性な α -置換- α 、 β -飽和カルボニル化合物の製造に有用な還元酵素およびその産物である酵素に関する。

- 20 この新規な酵素遺伝子およびその産物である酵素は、種々の光学活性 (α 位の絶対配置は置換基によりS体またはR体となる。) を有する飽和カルボン酸やアミドなどの光学活性カルボニル化合物の製造分野に利用することができる。光学活性を有するカルボニル化合物は、古典的な化学プロセスでは調製が困難な、価値の高いキラル構築ブロックであり、特に医薬や農薬の原料として有用な物質群である。

従来技術

- 25 近年、微生物の炭素・炭素二重結合の還元により様々な化合物、特に光学活性体を製造する方法が注目され、種々の α 、 β -炭素・炭素二重結合を有

し、かつ α 位に置換基を持つカルボニル化合物の炭素・炭素二重結合を微生物的に還元して対応する α 位に置換基を持つ α , β -飽和カルボニル化合物を製造する方法が報告されている（例えば、Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 33(1981)、Arch. Microbiol. 135, 51(1983)、Helv. Chim. Acta., 62, 455(1979)、J. Ferm. Bioeng., 84, 195(1997)参照。）。

しかしながら、これらの方法で用いられている活性微生物から還元酵素が分離同定されている例は無い。そもそも、このグループに属する酵素の研究は、その不安定性のため分離同定が困難であることから極めて少ない。本発明の酵素も例外では無く、通常の方法では早い失活のため分離同定が不可能であった。

このためこれらの還元酵素を化合物製造に用いようとする時、遺伝子工学や代謝工学的なアプローチにより改善することは困難であり、それゆえ効率的な製法改良ができないという状況にあった。

15 発明の開示

したがって、本発明は、 α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の炭素・炭素二重結合を、微生物を用いて還元して対応する α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物を製造するのに有用な触媒酵素およびその遺伝子を提供することを課題とする。

20 本発明者らは、 α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の該炭素・炭素二重結合を還元して対応する α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物を生成する微生物が、驚くべきことに、好気性あるいは通性嫌気性細菌の比較的多くの属に渡って分布していることを土壌からの徹底的なスクリーニングにより見出している（特開平10-224821号公報等）。

特にシュードモナス属(*Pseudomonas*)またはバークホルデリア属(*Burkhold*

eria)に属する微生物に本活性を有する株が多く存在すること、これらの株の中には α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -ハロカルボニル化合物を還元して、純度の極めて高い α 位の絶対配置S体の α -ハロ- α 、 β -飽和カルボニル化合物を生成しうるものが存在することを見出した。

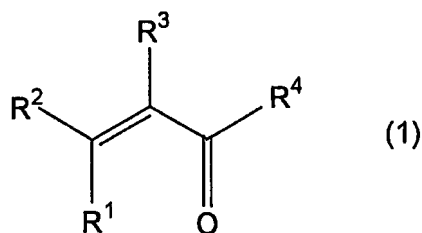
- 5 さらに本発明者らはこれらの活性微生物を用いて光学活性な α -置換- α 、 β -飽和カルボニル化合物を製造する方法を確立することに成功し、この製法をさらに改良すべく還元酵素本体の同定さらにはその遺伝子の特定を目指して鋭意研究した結果、触媒酵素を同定し、作用機作の解明と高活性生物の取得に成功し、本発明に至ったものである。
- 10 すなわち、本発明は、以下の還元酵素遺伝子、プラスミド、形質転換体、タンパク質、そのタンパク質をコードする遺伝子の製造方法及び α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子に関する。
1. α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする、配列番号19で示される塩基配列からなるDNAまたは
- 15 前記DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAからなる遺伝子。
2. α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする、配列番号17で示される塩基配列からなるDNAまたは前記DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAからなる
- 20 遺伝子。
3. α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする、配列番号18で示される塩基配列からなるDNAまたは前記DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズするDNAからなる遺伝子。
- 25 4. 配列番号20で示されるアミノ酸配列及び配列番号21で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列を含むことを特徴とする α -置換- α 、 β

ー不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

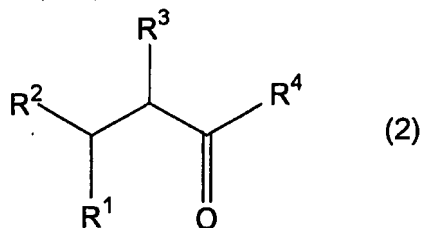
5. 配列番号 20 で示されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
6. 配列番号 21 で示されるアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
7. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子が、アセトバクター (Acetobacter) 属、アクチノマイセス (Actinomyces) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、エアロモナス (Aeromonas) 属、アルカリジェネス (Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、アゾトバクター (Azotobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、プレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、バークホルデリア (Burkholderia) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、エンテロコッカス (Enterococcus) 属、エッシェリッチシア (Escherichia) 属、フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、ハロバクテリウム (Halobacterium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、クレブシラ (Klebsiella) 属、ラクトバシラス (Lactobacillus) 属、マイクロバクテリウム (Microbacterium) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、マイクロポリスポラ (Micropolyspora) 属、マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、ノカルディア (Nocardia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、シュードノカルディア (Pseudonocardia) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属、ストレプトコッ

カス (Streptococcus) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属及びキサントモナス (Xanthomonas) 属からなる群より選ばれる 1 種以上の微生物に由来するものである前記 1 乃至 6 のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

- 5 8. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子が、シュードモナス (Pseudomonas) 属微生物に由来する前記 7 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
9. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子が、バークホルデリア (Burkholderia) 属微生物に由来する前記 7 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
- 10 10. シュードモナス属微生物が、シュードモナス・エスピー・SD810 株 (Pseudomonas sp. SD810) である前記 8 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
11. シュードモナス属微生物が、シュードモナス・エスピー・SD811 株 (Pseudomonas sp. SD811) である前記 8 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
- 15 12. シュードモナス属微生物が、シュードモナス・エスピー・SD812 株 (Pseudomonas sp. SD812) である前記 8 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
13. バークホルデリア属微生物が、バークホルデリア・エスピー・SD816 株 (Burkholderia sp. SD816) である前記 9 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
14. 還元酵素が、炭素・炭素二重結合の還元によって、 α 位がキラルな S 体化合物を生成する触媒能を有することを特徴とする前記 1 乃至 13 のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
- 25 15. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物が、下記一般式 (1)

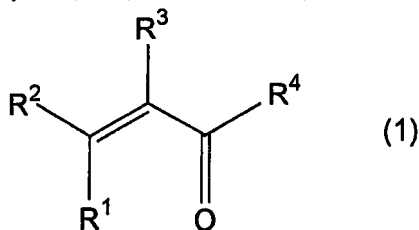


- (式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は独立に水素原子、ハロゲン原子、炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐状脂肪族炭化水素基、炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、置換されていてもよい芳香族基または含窒素、含酸素もしくは含硫黄複素環基を表わし、 R^4 はヒドロキシル基、炭素数1～3の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基または1級～3級アミノ基を表わす。但し、 R^3 は水素原子であることはない。)
- 5 5 で示される化合物であり、還元された化合物が下記一般式(2)

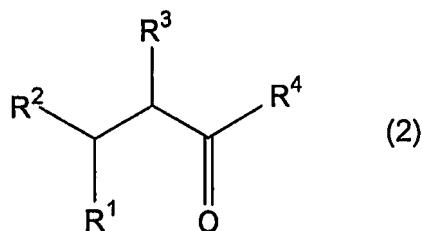


- 10 (式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は上記と同じ意味を表わす。)で示される化合物である前記1乃至14のいずれかに記載の α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

16. α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物が、下記一般式(1)



- 15 (式中、 R^1 、 R^2 が水素原子、 R^3 がハロゲン原子、 R^4 がヒドロキシル基を表わす。)で示される α -ハロアクリル酸であり、還元された化合物が、下記一般式(2)



(式中、 $R^1 \sim R^4$ は上記と同じ意味を表わす。)で示される絶対配置Sの α -ハロプロピオン酸である前記15に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

5 17. R^3 が臭素原子である前記16に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

18. R^3 が塩素原子である前記16に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

10 19. R^3 がフッ素原子である前記16に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

20. 前記1乃至19のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子DNAを含んでなることを特徴とするプラスミド。

15 21. 前記1乃至19のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子と、NADPH類を補酵素として機能する酵素遺伝子を共に含むことを特徴とするプラスミド。

22. 前記20または21に記載のプラスミドで形質転換されてなる形質転換体。

20 23. 前記20に記載のプラスミドと、NADPH類を補酵素として機能する酵素遺伝子を含むプラスミドで同時に形質転換されてなる形質転換体。

24. 前記1乃至19のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子の発現産物である α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質、または前記タンパク質を構

成する1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質。

25. 配列番号20で示されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列質において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質。

26. 配列番号21で示されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質。

27. 配列番号19に示される塩基配列のうち631番目の塩基より上流側の塩基配列から選択された塩基配列と、3543番目の塩基より下流側の塩基配列から選択された塩基配列とを相互に逆鎖の関係になるように組み合わせたプライマーを用いることを特徴とする α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の製造方法。

28. 配列番号19に示される塩基配列のうち631番目の塩基より上流側の塩基配列から選択された塩基配列と、2274番目の塩基より下流側の塩基配列から選択された塩基配列とを相互に逆鎖の関係になるように組み合わせたプライマーを用いることを特徴とする置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の製造方法。

29. 配列番号19に示される塩基配列のうち2547番目の塩基より上流側の塩基配列から選択された塩基配列と、3543番目の塩基より下流側の塩基配列から選択された塩基配列とを相互に逆鎖の関係になるように組み合わせたプライマーを用いることを特徴とする α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の製造方法。

30. 前記22乃至23に記載の形質転換体培養物および／または処理物を用いることを特徴とする α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元方法。

5 図面の簡単な説明

図1は、シュードモナス・エスピー・SD811株の培養炭素源による反応曲線の差違を示すグラフである。

図2は、バークホルデリア・エスピー・SD816株の培養炭素源による反応曲線の差違を示すグラフである。

10 図3は、バークホルデリア・エスピー・SD816株の培養炭素源による生成タンパク質の相違を、二次元電気泳動で比較した結果である。

図4は、CAA43遺伝子とCAA67遺伝子の位置関係、および各DNA断片（配列番号をNo.で記載）の位置を示す概略図である。

図5は、不斉還元酵素遺伝子発現用ベクターの設計を示す概略図である。

15

発明の詳細な説明

本発明において、 α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子およびその産物である酵素は、アセトバクター(Acetobacter)属、アクチノマイセス(Actinomyces)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、エアロモナス(Aeromonas)属、アルカリジエネス(Alcaligenes)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、アゾトバクター(Azotobacter)属、バシラス(Bacillus)属、ブレヴィバクテリウム(Brevibacterium)属、バークホルデリア(Burkholderia)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、エンテロコッカス(Enterococcus)属、エッシェリッシア(Escherichia)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、グルコノバク

20

25

ター (Gluconobacter) 属、ハロバクテリウム (Halobacterium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、クレブシラ (Klebsiella) 属、ラクトバシラス (Lactobacillus) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ミクロコッカス (Micrococcus) 属、ミクロポリスポラ (Micropolyspora) 属、マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、ノカルディア (Nocardia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、シュードノカルディア (Pseudonocardia) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属、ストレプトコッカス (Streptococcus) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、キサントモナス (Xanthomonas) 属のいずれかに属する微生物に存在する。

好適にはシュードモナス (Pseudomonas) 属あるいはバークホルデリア (Burkholderia) 属微生物に由来する。

本発明において用いる由来微生物としては、 α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の α 、 β -炭素・炭素二重結合を還元する活性を有する株であれば特に制限はないが、例えば、シュードモナス・エスピー・SD 810 株、シュードモナス・エスピー・SD 811 株、シュードモナス・エスピー・SD 812 株、またはバークホルデリア・エスピー・SD 816 株等が好適である。

中でも比較的高い還元活性の観点から、シュードモナス・エスピー・SD 811 株またはバークホルデリア・エスピー・SD 816 株が特に好適に用いられる。

シュードモナス・エスピー・SD 810 株、シュードモナス・エスピー・SD 811 株、シュードモナス・エスピー・SD 812 株またはバークホルデリア・エスピー・SD 816 株等は、土壌中から単離されたものであり、各種のカルボニル化合物を分解資化する能力を有している。

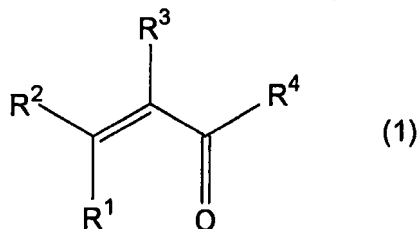
これらシュードモナス・エスピー・SD 810 株、シュードモナス・エ

ピー・SD811株およびシュードモナス・エスピー・SD812株は、それぞれ生命研菌寄第BP-6767号(FERM BP-6767) [生命研菌寄第16746号(FERM-16746) から移管]、生命研菌寄第BP-6768号(FERM BP-6768) [生命研菌寄第16747号(FERM 16747) から移管] および生命研菌寄第BP-6769号(FERM BP-6769) [生命研菌寄第16748号(FERM BP-6769) から移管]、バークホルデリア・エスピー・SD816株は、生命研菌寄第BP-6770号(FERM BP-6770) として生命工業技術研究所に寄託されている。

- 10 これらの分離・培養は、特開平10-224821号公報に詳細に示されている方法等を用いることができる。

上記活性微生物では、培養条件によってその還元活性が異なることがある。すなわち、還元基質である α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物を炭素源として培養した場合と、糖類など一般的な炭素源を用いて培養した場合で菌体が生ずる α 、 β -炭素・炭素二重結合の還元活性が異なり、還元基質を炭素源として培養した菌体は反応開始時から高い還元活性を示すことがある。このことは還元酵素の一部または全てが還元基質によって誘導されることを示唆しており、この差を解析することによって還元酵素を同定することが可能となる。

- 20 還元活性の高い菌体を得る培養の炭素源としては一般式(1)



で示される化合物を用いることができる。一般式(I)中、 R^1 、 R^2 は独立に水素原子、ハロゲン原子、炭素数1~6の直鎖状もしくは分岐状脂肪族炭

化水素基、炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基、ヒドロキシル基、カルボキシ基、置換されていてもよい芳香族基または飽和もしくは不飽和含窒素、含酸素もしくは含硫黄複素環基を表わす。好ましい R^1 、 R^2 としては水素原子を挙げることができる。

- 5 R^3 はハロゲン原子、炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐状脂肪族炭化水素基、炭素数1～6の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基、ヒドロキシル基、カルボキシ基、置換されていてもよい芳香族基または飽和もしくは不飽和含窒素、含酸素もしくは含硫黄複素環基を表す。好ましい R^3 としてはハロゲン原子、特に塩素原子、臭素原子を挙げることができる。

- 10 R^4 はヒドロキシル基、炭素数1～4の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基、1級～3級アミノ基を表わし、好ましい R^4 としてはヒドロキシル基を挙げることができる。

- 具体的には α -クロロアクリル酸、 α -ブromoアクリル酸、2-クロロ-2-ブテン酸、2-ブromo-2-ブテン酸、2-クロロ-2-ペンテン酸、
15 2-ブromo-2-ペンテン酸、それらのメチルエステル、エチルエステルなどが挙げられ、好ましくは α -クロロアクリル酸、 α -ブromoアクリル酸である。

- すなわち、通常の細菌に用いられる無機塩培地（例えば、 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L、 NaH_2PO_4 1 g/L、 K_2HPO_4 1 g/L、 $MgSO_4$ 0.1 g/L、酵母エキス0.5 g/L）に、例えば、 α -クロロアクリル酸のよ
20 うな α 位に置換基を持つ α 、 β -不飽和カルボニル化合物を実質的に唯一の炭素源として2 g/L添加した最少培地5 mLに菌株を植菌し、28℃で12～72時間振とう培養を行うと、還元活性の高い菌体を得られる。一方、上記培養条件のうち炭素源だけを還元基質の代謝生成物、例えば、 α -クロ
25 ロアクリル酸などの置換アクリル酸の場合は乳酸に変えて培養すると、反応初期には還元活性を示さない菌体を得られる。

これらの菌体をそれぞれ遠心分離に供して回収し、フレンチプレス等の方法により破壊して得た無細胞抽出液をカラムクロマトグラフィーに供してタンパク質の分離パターンを比較すると、両者で異なるタンパク質が見いだされる。

- 5 このうち還元基質を用いて培養した菌体で生成量が増加したタンパク質を分離し、その活性を測定すれば酵素の同定が可能である。しかしながら一般に、これらの酵素は無細胞抽出液の状態では安定性が低く、比較的速やかに活性が消失してしまうため分離同定が困難な場合が多い。これこそがこの群に属する酵素の研究が他の安定な酵素に比して遅れている一因となっている。
- 10 このような場合、窒素雰囲気下などで分離作業を行う事で活性を保つことができる場合もあるが、まずタンパク質の部分配列を明らかにし、部分配列から推定したDNA塩基配列をプローブとして遺伝子をクローニングし、この遺伝子を発現させてタンパク質を著量取得した後活性などの解析を行う方法が有効である。
- 15 すなわち、異なる炭素源を用いて無細胞抽出液を二次元タンパク質電気泳動などで分離したタンパク質の生成パターンを比較して、還元基質で培養した菌体で増加しているタンパク質を見いだす。このタンパク質をPVDFメンブレンなどに移して、気相エドマン分解装置などによりN末端配列の解析を行う。得られたN末端配列から、DNA塩基配列を推測し、オリゴヌクレオチドを合成することにより、染色体から還元酵素群の遺伝子を取得するの
- 20 に有用なプローブ（ある配列のDNAを見出す時に用いる、識別可能な標識を施したDNA断片）を作成する。

- 本発明の還元酵素遺伝子は、このようにして作成したDNAプローブを用いて、遺伝子工学で用いられるサザンハイブリダイゼーション等の通常の方法によって容易に取得することができる。すなわち、前記微生物から抽出したDNA（染色体及びプラスミドを持つ場合はプラスミドを含む）を適当な
- 25

制限酵素で切断して断片化し、アガロースゲル電気泳動などの方法でサイズ分離した後ニトロセルロース膜に転写した断片に対して、識別可能な標識を施したプローブをハイブリダイゼーション（DNAとDNAの間で、その塩基配列に相補性が高いときに二重鎖を形成することで、対合とも言う）させることで、プローブと特異的にハイブリダイゼーションする断片、すなわち

5 目的遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。このとき、遺伝子が途中で切断された部分断片が取得される場合もあるが、制限酵素の種類を変えて同様の検出を行ったり、先に取得された部分断片をプローブとして用いるなどして、遺伝子全体を取得することができる。

- 10 本発明の還元酵素群の遺伝子に対してハイブリダイゼーション法を用いる場合、ハイブリダイズさせるDNAの長さによって最適な条件には違いがあるが、十分に特異的なハイブリダイゼーション結果が得られるストリンジェント条件は、通常のハイブリダイゼーション溶液の塩濃度範囲で約40℃～70℃、好ましくは47℃～60℃である。

- 15 本発明の還元酵素群の遺伝子は、遺伝子およびその周辺配列の適当な位置にハイブリダイゼーションするプライマーを作成し、前記の微生物DNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によっても容易に取得することができる。

- プライマーとは、コピーしたいDNA鎖にハイブリダイゼーションし、DNA合成開始点となり得る断片である。DNAの酵素合成は、鋳型DNAに
- 20 ハイブリダイゼーションしたプライマーの3'-OH部分にDNAポリメラーゼがデオキシリボヌクレオチドをジエステル結合する形で進むため、DNAの複製の開始にはプライマーが必須である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）でもプライマーが使用され、このプライマーの選択によって目的のDNA
- 25 Aを正しく効率良くコピーできるかが決まる。

本発明において用いることができるプライマーは、本発明の還元酵素遺伝

子およびその周辺配列にハイブリダイゼーションしてDNA合成開始点となり得るものであれば特に制限は無く、例えば、断片の配列相補性の高さの度合い、断片の長さ、断片に対する修飾などに制限は無い。例えば、生成する断片をプラスミドに接続するためのアダプタ配列を含むプライマー、生成した遺伝子断片の検出を容易にする蛍光物質で修飾したプライマー等を目的に
5 応じて自由に設計し用いることができる。

本発明において有用な還元酵素群の遺伝子を得るのに有用な一組のプライマーは、配列番号 19 に示される塩基配列のうち、上流遺伝子の開始コドンの第一塩基である 6 3 1 番目の塩基より上流の配列を含む一つと、下流遺伝子終了コドンの第三塩基である 3 5 4 3 番目の塩基より下流の配列を含む他
10 一つを、相互に逆鎖の関係となるよう組み合わせたものである。また、有用な他の一組のプライマーは、配列番号 19 に示される塩基配列のうち、上流遺伝子の開始コドンの第一塩基である 6 3 1 番目の塩基より上流の配列を含む一つと、上流遺伝子の終了コドン第三塩基である 2 2 7 4 番目の塩基より
15 下流の配列を含む他一つを、相互に逆鎖の関係となるよう組み合わせたものである。さらに有用な他の一組のプライマーは、配列番号 19 に示される塩基配列のうち、下流遺伝子の開始コドンの第一塩基である 2 5 4 2 番目の塩基より上流の配列を含む一つと、下流遺伝子終了コドンの第三塩基である 3 5 4 3 番目の塩基より下流の配列を含む他一つを、相互に逆鎖の関係となる
20 よう組み合わせたものである。この 3 種の組み合わせで、それぞれ遺伝子群全体、上流遺伝子、下流遺伝子のいずれかを含むDNA断片を得ることができる。さらに、配列番号 17 で示される塩基配列の両末端 10 数個から数 10 個の塩基配列を、相互に逆鎖の関係となるよう組み合わせた一組のプライマーも有用である。この組み合わせでは、配列番号 17 で示される塩基配列
25 に相当するDNAを作成することができ、本発明の下流遺伝子に相当する遺伝子を作成することができる。同様にして、配列番号 18 で示される塩基配

列の両末端10数個から数10個の塩基配列を、相互に逆鎖の関係となるよう組み合わせた一組のプライマーも有用である。この組み合わせでは、配列番号18で示される塩基配列に相当するDNAを作成することができ、本発明の上流遺伝子に相当する遺伝子を作成することができる。

- 5 これらのプライマーを用いて遺伝子を取得する方法に特に制限は無いが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が最も簡便に用いることのできる方法である。反応条件はDNA合成反応による生成物が取得される限り制限は無いが、通常変性温度は90℃～100℃、好ましくは94℃～98℃、アニーリング温度は30℃～70℃、好ましくは37℃～65℃、さらに好ましくはプライマーのT_mより5℃高い温度、伸長温度は65℃～75℃、好ましくは72℃からそれぞれの最適条件を組み合わせ用いることができる。反応サイクル数は生成物が必要量取得できるまで繰り返すことができるが、通常15～50サイクル程度から選択すればよい。取得される遺伝子の配列は鋳型とするDNA鎖の配列、合成に用いるDNAポリメラーゼの校正機構
- 10 （proofreading function；DNAの複製時に誤って取り込まれた塩基を、DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって取り除くことで誤りを無くす機能）強度によって相互に配列の異なる部分を持つ近縁の変異体が取得されるが、これら近縁の還元酵素遺伝子は、プライマーの設計の元となったオリジナルの還元酵素遺伝子と同様に本発明に用いることがで
- 15 きる。
- 20 これらの遺伝子を、一般的に知られる発現ベクター等を用いて宿主生物体内で発現できる形で生物に導入することにより、 α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の該炭素・炭素二重結合を還元して対応する α -置換- α 、 β -飽和カルボニル化合物を生成する高い還元活性を示す生物を作出できる。この時、下流遺伝子は単独ではなく、上流遺伝子と
- 25 組み合わせて用いることにより還元活性を得ることが出来る。

本発明の還元酵素遺伝子を発現させる生物としては、特に制限は無いが、宿主ベクター系の開発されている微生物、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属などの細菌、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、チゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*)、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodosporidium*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属などの酵母、ノイロスポラ (*Neurospora*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*)、セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属などに属するカビなどが挙げられる。好適な微生物の一例としては、大腸菌が挙げられる。作出した活性微生物は、前記の酵素誘導基質を炭素源とした培地を用いる必要が無く、一般的な栄養培地、すなわち LB 培地等で培養することで活性微生物菌体を得ることができる。

作出した還元活性微生物を用いる還元反応の条件は、特開 2000-106891 に開示されている本酵素起源微生物の反応と同様にして行うことができる。

すなわち、 α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の炭素・炭素二重結合の還元反応は、前記微生物が持つ還元力が安定に発現する条件下であれば、該微生物の培養液中、前記方法により培養して得た菌体、または前記方法により培養して得た菌体を破碎して得られる無細胞抽出液等の微生物の処理物のいずれを用いても行うことができる。

すなわち、培養して得た菌体を用いる場合は、基質となる α 、 β -炭素・

炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物を培養液に、0.1質量%
～10質量%の濃度、好ましくは0.2質量%～2質量%の濃度になるよう
に連続的または回分的に添加し、培養温度15℃～40℃、好ましくは25
℃～37℃で培養し、培養液中に相当する α -置換- α , β -飽和カルボニ
5 ル化合物を生成させることができる。

あるいは、前記方法により培養して得た培養物から遠心分離などの方法で
回収した菌体を、適当な溶液、例えば希薄なpH緩衝溶液のごとき水溶液に
懸濁した溶液に、基質となる α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換
カルボニル化合物を、例えば、0.1質量%～10質量%の濃度、好ましく
10 は0.2質量%～2質量%の濃度になるように連続的または回分的に添加し、
反応温度15℃～50℃、好ましくは、25℃～37℃、より好ましくは2
8℃～35℃、反応pH6.0～9.0、好ましくは、pH6.5～7.3
に調節して反応させ、該菌体懸濁液中に相当する α -置換- α , β -飽和カル
ボニル化合物を生成させることができる。pH維持は、水性バッファ、た
15 とえばリン酸カリウムもしくはトリス/HClを10mM～1Mの範囲で含
むような水性バッファで行うことが好ましい。

α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の添加の
時期と、速度または回数は、反応が目的時間内で終了するような範囲で自由
に選択できる。

20 微生物の処理物を用いる場合は、例えば、前記培養法による培養物を遠心
分離に供して回収した菌体を、フレンチプレス等の方法により破壊して得た
無細胞抽出液を、基質となる α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換
カルボニル化合物の濃度が、0.1質量%～10質量%、好ましくは0.2
質量%～2質量%であり、反応液のpH維持に有効な成分を10mM～1M
25 の範囲で含むような反応液に添加して、反応温度15℃～50℃、好ましく
は28℃～35℃の範囲で反応させ、相当する α -置換- α , β -飽和カル

ボニル化合物を生成させることができる。

さらに本発明においては、 α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の還元活性の維持に有効な物質、たとえば使用する微生物が酸化することのできる糖や有機酸のごとき化合物、好ましくはグルコース
5 やL-乳酸等を、単独で、あるいは α -クロロアクリル酸との混合溶液として反応中、0.1質量%~10質量%の濃度、好ましくは0.2質量%~1質量%の濃度になるように連続的または回分的に添加しながら反応させることができる。 α -クロロアクリル酸とこれら被酸化物質との添加割合は1~20:1の間で任意に選択できる。この糖や有機酸の添加により反応時間を
10 延長することができる。このことにより、目的生成物である α -ハロ- α 、 β -飽和カルボニル化合物の反応液中の濃度を高くすることができ、生成物を単離収得するのに好ましい。特にこれらの被酸化物質を用いて補酵素NADPHの還元型を効率良く再生できる系を強化するため、適当な酸化還元酵素遺伝子、例えば、リンゴ酸脱水素酵素遺伝子やグルタミン酸脱水素酵素遺
15 伝子を、還元酵素遺伝子と共発現するよう微生物に導入することによって、生産性を大幅に改善することができる。このような方法は、例えば特開昭61-128895、Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 6, 221-270(1988)に開示されている。

反応は培養中で無い場合は、好氣的、嫌氣的いずれの環境でも行うことができる。
20 菌体または無細胞抽出液と基質である α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換ハロカルボニル化合物の比率、あるいは基質の添加の時期、速度または回数は、反応が目的時間内で終了するような範囲で自由に選択できる。

本発明においては、 α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボ
25 ニル化合物の還元によって生成する α -置換- α 、 β -飽和カルボニル化合物は、使用する微生物にとって代謝中間体であってさらに分解を受ける場合

がある。このような場合には、分解活性を持たない宿主微生物を選択するか作成することにより分解反応を停止させることができる。

さらに、本発明で用いられる微生物の菌体あるいは無細胞抽出液は、慣用の方法、たとえば、吸着、包括、架橋などの方法により、種々の固定化担体
5 に固定化して用いることができる。担体の種類は特に制限されず、たとえば、セルロースなどの多糖系材料、ポリマー系材料、コラーゲン等のタンパク質系材料などを用いることができる。

本発明で生成した α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物は、常用の溶媒抽出、蒸留といった精製法を用いて、単離精製することができる。たとえば、 α -クロロアクリル酸から生成した α -クロロプロピオン酸は、培養液
10 や反応液から有機溶媒抽出、蒸留等に従うことにより得ることができる。また、 α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物は α 位についてプロキラルな分子であるが、本発明の還元法によって生成するキラルな α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物の鏡像異性体の純度は、キラルカラム材料でのGC、HPLCあるいは旋光計で決定することができる。
15

このように、本発明は、 α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の炭素・炭素二重結合を還元して対応する絶対配置S体の α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物を製造するのに有用な還元酵素群およびその遺伝子群を提供するものである。さらに、これらの遺伝子を用いて
20 高生産生物を取得し、これを用いた製造方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。実施例中、全ての塩基配列決定では、PCR産物をプラスミドに組み込むことなく、直接鋳型として使用し、
25 DNAシーケンサーmodel 377 (ABI社製)の標準的な反応・分離

・解析条件により両鎖について解読した。

実施例 1 : α , β -炭素・炭素二重結合を有する α -ハロカルボニル化合物の還元活性の検出

- 5 還元活性の検出は、 α -クロロアクリル酸または α -クロロ α , β -ブテン酸を基質として、還元生成物である α -クロロプロピオン酸、 α -クロロ酪酸を、ガスクロマトグラフィーを用いて定量した。遠心に供して菌体を除去した反応液または培地上清 0.4mL に、0.4mL の 2N HCl を混合した後、次の条件でガスクロマトグラフィー分析を行った。
- 10 本体 : GC-7A (株式会社島津製作所製)、
カラム : Thermo n-3000 / SHINCARBON A 2.6mm
×2.1m、
キャリアガス : 窒素 50mL/min、
検出 : FID、
- 15 カラム温度 : 200°C (一定)、
インジェクション : 2~10 マイクロリター、260°C、
記録 : クロマトコーダー 12 (SIC)。

実施例 2

- 20 (1) シュードモナス・エスピー・SD811 株の還元基質を炭素源とした培養
- シュードモナス・エスピー・SD811 株を次の培地において培養した。
- 培地組成 : α -クロロアクリル酸 (2g/L)、酵母抽出物 (0.5g/L)、
硫酸アンモニウム (2g/L)、リン酸二水素ナトリウム (1g/L)、リ
- 25 ン酸水素二カリウム (1g/L)、硫酸マグネシウム (0.1g/L)。
- 培地の作成は以下のような手順にて行った。

前記成分のうち、 α -クロロアクリル酸および硫酸マグネシウムを除く全成分を950 mLの水に溶解してpH値を7.0に調整し、5 Lのフラスコに入れ、121℃で20分間滅菌した。続いて、この培地の温度が70℃程度まで下がった後、 α -クロロアクリル酸および硫酸マグネシウムを50 mL
5 の水に溶解してpH値を7.0に調整した溶液を滅菌フィルターで滅菌した後混合した。さらに酸素の供給やpH調節をすることなく、この培地に5%予備培養物(OD_{660nm}=1.10)を接種し30℃で12~24時間、振とうしながら株を培養した。

(2) シュードモナス・エスピー・SD811株の還元生成物を炭素源とした培養
10

シュードモナス・エスピー・SD811株を次の培地において培養した。
培地組成：L-乳酸(2 g/L)、酵母抽出物(0.5 g/L)、硫酸アンモニウム(2 g/L)、リン酸二水素ナトリウム(1 g/L)、リン酸水素二カリウム(1 g/L)、硫酸マグネシウム(0.1 g/L)。

15 培地の作成は以下のように行った。

前記成分のうち、L-乳酸および硫酸マグネシウムを除く全成分を950 mLの水に溶解してpH値を7.0に調整し、5 Lのフラスコに入れ、121℃で20分間滅菌した。続いて、この培地の温度が70℃程度まで下がった後、L-乳酸および硫酸マグネシウムを50 mLの水に溶解してpH値を7.
20 0に調整した溶液を滅菌フィルターで滅菌した後混合した。さらに酸素の供給やpH調節をすることなく、この培地に5%予備培養物(OD_{660nm}=1.10)を接種し30℃で12~24時間、振とうしながら株を培養した。

実施例3： α -クロロアクリル酸を基質とする菌体懸濁反応

25 実施例2において、2種の異なる炭素源を用いて培養したシュードモナス・エスピー・SD811株を、それぞれ遠心分離に供して菌体を回収した。

この菌体を、 α -クロロアクリル酸0.2%、リン酸緩衝液100mM (pH7.3)を含む溶液 (pH7.3に調整) 20mLに懸濁し、28℃で振とうして反応させた。

- 反応液から、特定の時点で0.5mLのサンプルを採取し、遠心に供して菌
- 5 体を除去した上清0.4mLに、0.1mLの6NHClを混合した後、0.4mLの酢酸エチルにより生成物を抽出し、抽出サンプルを実施例1の方法により分析した。

- 還元基質を用いて培養した菌体の反応では、反応直後から α -クロロアクリル酸の消費に伴って、 α -クロロプロピオン酸の位置にピークが出現した。
- 10 反応速度は全ての基質を消費するまでほぼ直線的であった。一方、乳酸を炭素源として培養した菌体の反応では、反応開始直後は α -クロロアクリル酸の消費も α -クロロプロピオン酸のピークも見られず、開始から約5時間次第に還元活性が上昇した。結果を図1に示す。

15 実施例4

(1) パークホルデリア・エスピー・SD816株の還元基質を炭素源とした培養

- パークホルデリア・エスピー・SD816株を次の培地において培養した。
- 培地組成： α -クロロアクリル酸 (2g/L)、酵母抽出物 (0.5g/L)、
- 20 硫酸アンモニウム (2g/L)、リン酸二水素ナトリウム (1g/L)、リン酸水素二カリウム (1g/L)、硫酸マグネシウム (0.1g/L)。

培地の作成は以下のように行った。

- 前記成分のうち、 α -クロロアクリル酸および硫酸マグネシウムを除く全成分を950mLの水に溶解してpH値を7.0に調整し、5Lのフラスコに
- 25 入れ、121℃で20分間滅菌した。続いて、この培地の温度が70℃程度まで下がった後、 α -クロロアクリル酸および硫酸マグネシウムを50mL

の水に溶解してpH値を7.0に調整した溶液を滅菌フィルターで滅菌した後混合した。

さらに酸素の供給やpH調節をすることなく、この培地に5%予備培養物(OD_{660nm}=1.10)を接種し30℃で12~24時間、振とうしながら株を培養した。

(2) バークホルデリア・エスピー・SD816株の糖を炭素源とした培養
バークホルデリア・エスピー・SD816株を次の培地において培養した。
培地組成：D-グルコース(2g/L)、酵母抽出物(0.5g/L)、硫酸アンモニウム(2g/L)、リン酸二水素ナトリウム(1g/L)、リン酸水素二カリウム(1g/L)、硫酸マグネシウム(0.1g/L)。

培地の作成は以下のように行った。

前記成分のうち、D-グルコースおよび硫酸マグネシウムを除く全成分を950mLの水に溶解してpH値を7.0に調整し、5Lのフラスコに入れ、121℃で20分間滅菌した。続いて、この培地の温度が70℃程度まで下がった後、D-グルコースおよび硫酸マグネシウムを50mLの水に溶解してpH値を7.0に調整した溶液を滅菌フィルターで滅菌した後混合した。

さらに酸素の供給や、pH調節をすることなく、この培地に5%予備培養物(OD_{660nm}=1.10)を接種し30℃で12~24時間、振とうしながら株を培養した。

20

実施例5： α -クロロ α 、 β -ブテン酸を基質とする菌体懸濁反応

実施例4において、2種の異なる炭素源を用いて培養したバークホルデリア・エスピー・SD816株を、それぞれ遠心分離に供して菌体を回収した。この菌体を、 α -クロロ α 、 β -ブテン酸0.2%、リン酸緩衝液100mM(pH7.3)を含む溶液(pH7.3に調整)20mLに懸濁し、28℃で振とうして反応させた。

反応液から、特定の時点で0.5mLのサンプルを採取し、遠心に供して菌体を除去した上清0.4mLに、0.1mLの6N HClを混合した後、0.4mLの酢酸エチルにより生成物を抽出し、抽出サンプルを実施例1の方法により分析した。

- 5 還元基質を用いて培養した菌体の反応では、反応直後から α -クロロ- α , β -ブテン酸の消費に伴って、 α -クロロ酪酸の位置にピークが出現した。反応速度は全ての基質を消費するまでほぼ直線的であった。一方、乳酸を炭素源として培養した菌体の反応では、反応開始直後は α -クロロ- α , β -ブテン酸の消費も α -クロロ酪酸のピークも見られず、開始から約6~10
- 10 時間の間に次第に還元活性が上昇した。結果を図2に示す。

実施例6：タンパク質生成パターンの二次元電気泳動による解析

(1) 粗酵素抽出液の調整

- 実施例2で還元活性が異なることを確認したシュードモナス・エスピー・SD811株18時間培養菌体を遠心分離に供して菌体を回収した。滅菌水で洗浄した後、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に再懸濁した。菌体を超音波破碎機(BIOMC 7500 ULTRASONIC PROCESSOR (PULSED, 50 of %DUTY CYCLE, about 4.5 of OUTPUT CONTROL))で破碎し、未破碎の細胞と不溶物を遠心(16400×g, 5min, 4℃)して除去した。
- 15 SD811株18時間培養菌体を遠心分離に供して菌体を回収した。滅菌水で洗浄した後、50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に再懸濁した。菌体を超音波破碎機(BIOMC 7500 ULTRASONIC PROCESSOR (PULSED, 50 of %DUTY CYCLE, about 4.5 of OUTPUT CONTROL))で破碎し、未破碎の細胞と不溶物を遠心(16400×g, 5min, 4℃)して除去した。

- 20 同様にして、実施例5で還元活性が異なることを確認したバークホルデリア・エスピー・SD816株の粗酵素抽出液も調整した。

(2) 一次泳動：等電点電気泳動

- 尿素1.92g、30%アクリルアミド混液(アクリルアミド 29.2% (w/v)、N-N'-メチレンビスアクリルアミド0.8% (w/v)) 0.53mL、脱イオン水1.0mLを混合し、尿素が完全に溶解した後、10%ノニデットP-40 0.8mL、バイオライト3/10アンフォオライト(BIO-RA
- 25 L、脱イオン水1.0mLを混合し、尿素が完全に溶解した後、10%ノニデットP-40 0.8mL、バイオライト3/10アンフォオライト(BIO-RA

D) 200 μ L、10%過硫酸アンモニウム8 μ L, TEMED 5.6 μ Lを混合した。この溶液を、一方をシールしたガラス管（長さ13mm×内径2mm）に速やかに注入し、8M尿素溶液を積層し1～2時間静置してゲルを固化させた。

- 5 作成したゲルをセミマイクロドライゲル電気泳動装置（KS-8110、オリエンタルインスツルメンツ社製）に設置し、泳動上層と下層にそれぞれ20mM水酸化ナトリウム溶液と10mM硫酸溶液を入れ、200V15分、300V15分、400V30分プレランを行った。

- 泳動上層とゲル上部の水酸化ナトリウム溶液を取り除き、試料溶液（10
10 0～300 μ g/12.5 μ Lのタンパク質を含む溶液、10%ノニデットP-40 3 μ L、バイオライト3/10アンフォオライト（BIO-RAD）1.5 μ L、2-メルカプトエタノール1.5 μ Lを混合して調整したもの）をシリンジを用いてゲル上部に供し、続いてサンプルオーバーレイ溶液（尿素0.48g、10%ノニデットP-40 200 μ L、バイオライト3/10アンフォオラ
15 イト（BIO-RAD）50 μ L、脱イオン水380mLを混合したもの）20 μ L、さらに20mM水酸化ナトリウム液（適量）を積層し、泳動上層に20mM水酸化ナトリウム液を満たし、400Vで12時間、続いて800Vで1時間電気泳動した。

- 一次泳動の終了したゲルをガラス管から取り出し、40mLの脱イオン水
20 中で5分間室温振とうし、続いて4mLの平衡化緩衝液（0.5M Tris-HCl（pH6.8）0.5mL、10%SDS1.6mL、0.1%BPB0.05mL、2-メルカプトエタノール2mL、脱イオン水1.65mLを混合する）で20分間室温振とうした。

（3）二次泳動：SDS-PAGE

- 25 SDS-PAGEはスラブゲル装置（KS-8000 SE type, MARYSOL）を用いて通常の方法により行った。すなわち、平衡化が終了したゲルを12.5%SD

S-PAGEスラブゲル上端に0.5%アガロースを用いて固定し、25mA定電流で約4時間泳動した。

(4) タンパク質の検出：CBB染色

泳動終了したスラブゲル中のタンパク質の検出は、通常のCBB染色によって行った。すなわち、CBB溶液（クマジーブリリアントブルーR-250 0.25gをメタノール500mL、酢酸50mL、脱イオン水450mLに溶解）にて1時間染色した後、脱イオン水で洗浄し、続いて脱色液（メタノール50mL、酢酸70mL、脱イオン水880mL）で一昼夜脱色した。

その後ゲルを保存液（87%（w/v）グリセロール液23mL，エタノール150mL，脱イオン水327mL）に3時間浸透した。

シュードモナス・エスピー・SD811株のL-乳酸培養菌体および α -クロロアクリル酸培養菌体、パークホルデリア・エスピー・SD816株のD-グルコース培養菌体と α -クロロアクリル酸培養菌体から調整した粗酵素抽出液試料の二次元電気泳動分離パターンを比較した結果、それぞれの菌株の組で、ほぼ同じ位置に、 α -クロロアクリル酸培養菌体に特徴的な生成タンパク質が複数あることを見いだした。シュードモナス・エスピー・SD811株の結果を図3に示す。

実施例7（1）：末端配列の決定

実施例6で見いだした α -クロロアクリル酸培養菌体に特徴的なタンパク質を解析するため、実施例6で示したパークホルデリア・エスピー・SD816株の α -クロロアクリル酸培養菌体の試料について二次電気泳動分離したタンパク質を、セミドライ転写装置（TRANS-BLOT R SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)）を用いてPVDF膜（Immobilon TM Transfer membranes pore size: 0.45 μ m, MILLIPORE）に転写した。

転写は同機の標準的な使用方法に従い、限界電流0.8mA、13V、0.22~0.

26Aで45分間で行った。転写し終わったPVDF膜をCBB溶液で染色した後、 α -クロロアクリル酸培養菌体試料で特徴的に出現した3種のタンパク質に相当するスポットを切り出し、ペプチドシーケンサー (Model 491 Procise (Applied Biosystems)) にて分析した。その結果、その1種は既知酵素である脱ハロゲン酵素 (デハロゲナーゼ、L-D E X) であることが判明したが、残る2種は配列番号1および3に示した新規なペプチド配列を有することが判った。

実施例7 (2) : 内部配列の決定

さらに配列情報を得るため、実施例7で示した新規な2種のタンパク質について、リジルエンドペプチダーゼによるインゲル (in gel) 部分分解を行った。

実施例6の二次元電気泳動後、CBB染色したゲルから目的の2スポットに相当する部分を切り出し、そのゲル片にリジルエンドペプチダーゼを含むトリス緩衝液を加え、35℃で一晩消化した後、その反応液を下記条件の逆相HPLCに供して、断片化ペプチドを分離した。

カラム : TSK gel ODS—120T、

溶媒 : TFA/Acetonitrile系、グラジエント溶出、

流速 : 1.0mL/min、

検出波長 : 210nm。

得られたクロマトグラムから適当なピークを選択し、そのフラクションをペプチドシーケンサー (Model 491 Procise (Applied Biosystems)) にて分析した結果、配列番号2、4および5に示す3つの内部アミノ酸配列が得られた。

実施例8 : CAA43 N末端部分遺伝子断片の取得

まず、配列番号1および2に記載の、CAA43のN末端アミノ酸配列と内部アミノ酸配列に基づき縮重プライマー1および縮重プライマー2をそれぞれ設計した。

バークホルデリア・エスピー・SD816株 染色体DNAの抽出にはQIAGEN genomic-tip 100/GおよびQIAGEN Genomic DNA buffer set (いずれもQIAGEN社製)を使用した。

BIO-RAD iCycler (BIO-RAD社製)を用い、以下の条件でPCRを行った。

[反応液組成]

	バークホルデリア・エスピー・SD816株 染色体DNA	5 ng
10	プライマー1 (配列番号1に対応)	10 pmol
	プライマー2 (配列番号2に対応)	10 pmol
	TaKaRa LA Taq	0.5 unit
	dNTP混合物 (2.5mM each)	2.0 μ L
	10 \times LA PCR BUFFERII (Mg ²⁺ Free)	2.5 μ L
15	25 mM MgCl ₂	2.5 μ L
	滅菌蒸留水	25 μ Lに調整

[反応サイクル]

1 サイクル:

変性 (95 $^{\circ}$ C、4 min)、
20 アニール (47.9 $^{\circ}$ C、1 min)、
伸長 (72 $^{\circ}$ C、2 min)。

2~30 サイクル:

変性 (95 $^{\circ}$ C、1 min)、
25 アニール (47.9 $^{\circ}$ C、1 min)、
伸長 (72 $^{\circ}$ C、2 min)。

このバークホルデリア・エスピー・SD816株 染色体DNAを鋳型と

したPCRによりCAA43遺伝子の一部をコードすると考えられる、DNA断片（350bp）を得た。この部分断片の配列を配列番号11に示した。

実施例9：CAA43のC末端領域をコードする遺伝子断片の取得

- 5 実施例8で得られた配列番号11で示される塩基配列に基づいて、配列番号8および9に記載の下流方向のプライマー2種を設計した。これらのプライマーとTaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kitを用いてCAA43のC末端側をコードする遺伝子のクローニングを試みた。反応等は、Kitに添付の標準的な手法に従って行った。その結果、XbaI処理したバークホルデリア・エスピー・SD816株 染色体DNAを鋳型としたPCRでDNA断片（1.3kb）を取得し、その塩基配列を決定した。塩基配列を配列番号12に示したが、本配列中に終止コドンを確認した。

実施例10：CAA43のN末端領域およびその上流に存在する遺伝子の取得

- 15 得
- 実施例8で得られた配列番号11で示される塩基配列に基づいて、配列番号10に記載のinverted PCR（ゲノム工学の基礎参照、（2002）東京化学同人）用のプライマーを設計した。これと配列番号8に記載のプライマーを組み合わせ、SalI処理したバークホルデリア・エスピー・SD816株 染色体DNAを鋳型として下記条件によりinverted PCRを行った。

[反応液組成]

- | | | |
|-------------------|---------|---------|
| SD816株染色体DNA | SalI処理物 | 200ng |
| プライマー1（配列番号8） | | 10pmol |
| 25 プライマー2（配列番号10） | | 10pmol |
| TaKaRa | LATaq | 2.5unit |

d N T P 混合物 (2.5mM e a c h)	8.0 μ L
1 0 \times LA PCR BufferII (Mg ²⁺ Free)	5.0 μ L
2 5 mM Mg C l ₂	5.0 μ L
滅菌蒸留水	5 0 μ L に調整

5 [反応サイクル]

1 サイクル :

変性 (9 4℃、4.5m i n) 、
 アニールング (5 5℃、3 0 s e c) 、
 伸長 (7 2℃、4 m i n) 。

10 2 ~ 3 0 サイクル :

変性 (9 4℃、3 0 s e c) 、
 アニールング (5 5℃、3 0 s e c) 、
 伸長 (7 2℃、4 m i n) 。

その結果、約1.3k b のDNA断片が取得された。この断片の塩基配列を
 15 配列番号13に示したが、断片にはCAA43のN末端領域アミノ酸配列0.
 5k b の他、配列番号4で示されるCAA67の配列をコードする部分が含
 まれており、CAA67のC末端領域アミノ酸配列をコードすると考えられ
 る部分0.8k bを含むことが判明した。CAA67のコード領域はCAA4
 3のコード領域の上流に連続して存在しており、両遺伝子はクラスターを形
 20 成していることが明らかになった。

実施例11 : CAA67のN末端をコードするDNA断片の取得

実施例10で明らかになった、CAA67の内部アミノ酸配列をコードす
 る塩基配列を基に、配列番号14および15に記載のCAA67遺伝子の上
 25 流方向のプライマー2種を設計した。これらのプライマーとTaKaRa LA PCR
 in vitro Cloning Kitを用いてCAA67のN末端側をコードする遺伝子の

クローニングを試みた。反応等は、K i tに添付の標準的な手法に従って行った。その結果、P s t I 処理したバークホルデリア・エスピー・SD 8 1 6株染色体DNAを鋳型としたPCRでDNA断片（1.8 k b）を取得した。決定した塩基配列を配列番号1 2に示したが、配列番号4， 5に記載のCA
 5 A 6 7の内部アミノ酸配列と配列番号3に記載のCAA 6 7のN末端アミノ酸配列をコードするDNA断片であることを確認した。

実施例1 2：各遺伝子の全配列と遺伝子クラスター配列の決定：

実施例8、9、1 0で得られたDNA断片により、GENETYX—WIN/ATSQ核
 10 酸配列自動結合ソフトウェアにより、配列番号1 7に記載のCAA 4 3遺伝子の全塩基配列を決定した。同様に、実施例1 0および1 1で得られたDNA断片により、配列番号1 8に記載のCAA 6 7遺伝子の全塩基配列を決定した。さらに、実施例8～1 1で得られたDNA断片により、両遺伝子が存在する配列番号1 9に記載のクラスター塩基配列を決定した。配列番号
 15 2 0と2 1は、それぞれ配列番号1 7と1 8に対応するアミノ酸配列である。

実施例1 3：CAA 4 3及びCAA 6 7を含む遺伝子断片の作成

実施例1 2で得られた配列番号1 9で示される塩基配列に基づいて、配列番号2 2および2 3に記載のプライマーを設計した。これらを組み合わせて、
 20 バークホルデリア・エスピー・SD 8 1 6株 染色体DNAを鋳型として下記条件によりPCRを行い、還元酵素遺伝子全長をコードするDNA断片2 9 1 3 b pを作成した。

〔反応液組成〕（全量 5 0 μ L）

SD 8 1 6株染色体DNA（5 n g/ μ L）	4. 0 μ L
25 1 0 μ Mプライマー1（配列番号2 2）	1. 5 μ L
1 0 μ Mプライマー2（配列番号2 3）	1. 5 μ L

	TOYOBO KOD-Plus- (1 unit/ μ L)	1. 0 μ L
	dNTP混合物 (2.5mM each)	5. 0 μ L
	10 \times KOD PCR Buffer(Mg ²⁺ Free)	5. 0 μ L
	25mM MgSO ₄	2. 0 μ L
5	滅菌蒸留水	30 μ L

[反応サイクル]

1 サイクル:

変性 (94 $^{\circ}$ C、2 min)、

2 \sim 30 サイクル:

10 変性 (94 $^{\circ}$ C、15 sec)、

アニーリング (52. 3 $^{\circ}$ C、30 sec)、

伸長 (68 $^{\circ}$ C、3 min)。

実施例 14: CAA43 及び CAA67 発現系の構築

15 実施例 13 で得られた DNA 断片を発現ベクター pET101/D-TOP0 の T7 プロモーター下流に挿入し、大腸菌 BL21 (DE3) 株 (エッシェリシア・コリ BL21 (DE3)、Escherichia coli BL21(DE3)) に導入した。インサートとベクターのライゲーション、形質転換および遺伝子の発現には pET101 Directional TOP0 発現キット (Invitrogen) を用いた。

20

実施例 15: CAA43 及び CAA67 活性菌体を用いた還元反応

実施例 14 で得られた菌体を、5 ml の LB 培地 (1% Bacto Tryptone (DIFCO)、0.5% Bacto Yeast Extract (DIFCO)、1% Sodium chloride (Nacalai Tesque)、100mg/ml アンピシリン) で培養 (37 $^{\circ}$ C、130 rpm、10
25 h) した。得られた菌体を 1 ml の 60 mM リン酸バッファ (1 mM DTT 添加、pH 7.1) に懸濁した。菌体を超音波処理 (BRANSON Digital Sonif

ier) により破碎し、遠心 (15,000 r p m、4℃、10分) を行った。得られた菌体破碎液上清の還元活性を実施例1の方法に従い測定した。その際、各種の補酵素を反応液に添加して還元活性を測定したところ、反応液にNADPH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) を添加した時のみ、
5 十分な還元活性が観察された。

そこで次に、反応液 (3mM 2-CAA、0.65mM NADPH、60mM Ammonium acetate buffer (pH7.1)) にNADPHを1/10容量添加し、光路長0.2cmのセル中、30℃で反応させた時の経時的なNADPHの減少を339nmの吸光度変化で測定した。1分間あたりに1mmolのNADPHを減少させる酵素量を酵素活性の1 unit と定義し、比活性 (units/mg) をもとめた。形質転換体とE. coli BL21 (DE3) の2-CAA還元酵素活性を表1に示した。形質転換体で顕著な2-CAA還元活性が認められた。
10

表1 形質転換体と宿主の2-CAA還元酵素活性

Strain	比活性 (units/mg)
<u>E. coli</u> BL21 (DE3)	0.06
<u>E. coli</u> BL21 (DE3) pET101/D/67&43	0.92

15

産業上の利用可能性

本発明は、微生物の産生する酵素を用いて α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の炭素・炭素二重結合を還元して対応する α -置換 α 、 β -飽和カルボニル化合物を、経済性、操作性、プロセスの
20 安全性に優れた方法で製造するのに有用な高い触媒活性を有する関連酵素をコードする塩基酸配列を提供する。さらには、 α 位についてプロキラルな分子である α 、 β -炭素・炭素二重結合を有する α -置換カルボニル化合物の炭素・炭素二重結合に水素添加して、対応する α 位について医農薬等のキラ

ル構築ブロックとして有用な高純度の光学活性な α -置換- α , β -飽和カルボニル化合物を製造するのに有用な還元酵素およびその遺伝子を提供するものである。

あて名	名称	寄託日	寄託番号
日本国茨城県つくば市 東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)	独立行政法人	1998年4月2日	FERM BP-6767
	産業技術総合研究所	1998年4月2日	FERM BP-6768
	特許生物寄託センター	1998年4月2日	FERM BP-6769
		1999年6月28日	FERM BP-6770

請求の範囲

1. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする、配列番号 19 で示される塩基配列からなる DNA または
5 前記 DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA からなる遺伝子。
2. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする、配列番号 17 で示される塩基配列からなる DNA または
10 前記 DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA からなる遺伝子。
3. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする、配列番号 18 で示される塩基配列からなる DNA または
15 前記 DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズする DNA からなる遺伝子。
4. 配列番号 20 で示されるアミノ酸配列及び配列番号 21 で示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含むことを特徴とする α -置換- α , β -
20 不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。
5. 配列番号 20 で示されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において
1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有す
25 るタンパク質をコードする遺伝子。

6. 配列番号 21 で示されるアミノ酸配列、または前記アミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

5

7. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子が、アセトバクター (Acetobacter) 属、アクチノマイセス (Actinomyces) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、エアロモナス (Aeromonas) 属、アルカリジェネス (Alcaligenes) 属、アースロバクター (Arthrobacter) 属、アゾトバクター (Azotobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、プレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、バークホルデリア (Burkholderia) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、エンテロバクター (Enterobacter) 属、エンテロコッカス (Enterococcus) 属、エッシェリッチシア (Escherichia) 属、フラボバクテリウム (Flavobacterium) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、ハロバクテリウム (Halobacterium) 属、ハロコッカス (Halococcus) 属、クレブシラ (Klebsiella) 属、ラクトバシラス (Lactobacillus) 属、マイクロバクテリウム (Microbacterium) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、マイクロポリスポラ (Micropolyspora) 属、マイコバクテリウム (Mycobacterium) 属、ノカルディア (Nocardia) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、シュードノカルディア (Pseudonocardia) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、セラチア (Serratia) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属、ストレプトコッカス (Streptococcus) 属、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属及びキサントモナス (Xanthomonas) 属からなる群より選ばれる 1 種以上の微生物に由来するものである請求の範囲 1 乃至 6 のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

8. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子が、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属微生物に由来する請求の範囲 7 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

5

9. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子が、バークホルデリア (*Burkholderia*) 属微生物に由来する請求の範囲 7 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

10 10. シュードモナス属微生物が、シュードモナス・エスピー・SD810 株 (*Pseudomonas* sp. SD810) である請求の範囲 8 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

11. シュードモナス属微生物が、シュードモナス・エスピー・SD811 株 (*Pseudomonas* sp. SD811) である請求の範囲 8 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

12. シュードモナス属微生物が、シュードモナス・エスピー・SD812 株 (*Pseudomonas* sp. SD812) である請求の範囲 8 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

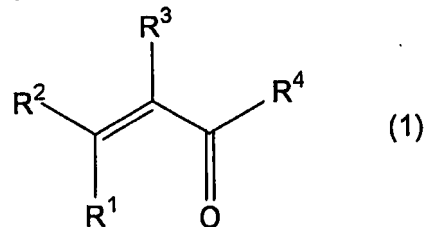
13. バークホルデリア属微生物が、バークホルデリア・エスピー・SD816 株 (*Burkholderia* sp. SD816) である請求の範囲 9 に記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

25

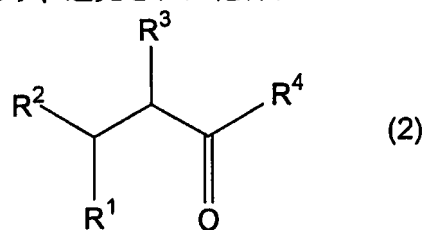
14. 還元酵素が、炭素・炭素二重結合の還元によって、 α 位がキラルな S

体化合物を生成する触媒能を有することを特徴とする請求の範囲 1 乃至 1 3 のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

- 5 15. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物が、下記一般式 (1)

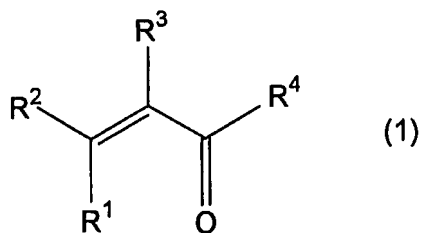


- (式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 は独立に水素原子、ハロゲン原子、炭素数 1～6 の直鎖状もしくは分岐状脂肪族炭化水素基、炭素数 1～6 の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、置換されていてもよい芳香族基または含窒素、含酸素もしくは含硫黄複素環基を表わし、 R^4 はヒドロキシル基、炭素数 1～3 の直鎖状もしくは分岐状アルコキシ基または 1 級～3 級アミノ基を表わす。但し、 R^3 は水素原子であることはない。) 10
で示される化合物であり、還元された化合物が下記一般式 (2)

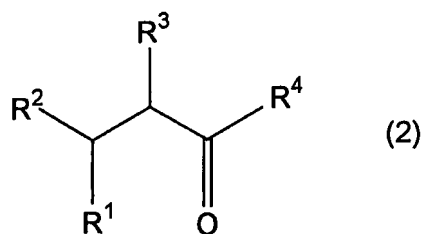


- (式中、 $\text{R}^1 \sim \text{R}^4$ は上記と同じ意味を表わす。) で示される化合物である請求の範囲 1 乃至 1 4 のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。 15

16. α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物が、下記一般式 (1)



(式中、 R^1 、 R^2 が水素原子、 R^3 がハロゲン原子、 R^4 がヒドロキシル基を表わす。)で示される α -ハロアクリル酸であり、還元された化合物が、下記一般式(2)



5

(式中、 $R^1 \sim R^4$ は上記と同じ意味を表わす。)で示される絶対配置Sの α -ハロプロピオン酸である請求の範囲15に記載の α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

10 17. R^3 が臭素原子である請求の範囲16に記載の α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

18. R^3 が塩素原子である請求の範囲16に記載の α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

15

19. R^3 がフッ素原子である請求の範囲16に記載の α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子。

20 20. 請求の範囲1乃至19のいずれかに記載の α -置換- α 、 β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子DNAを含んでなることを特徴とするプ

ラスミド。

21. 請求の範囲1乃至19のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子と、NADPH類を補酵素として機能する酵素遺伝子を共に含むことを特徴とするプラスミド。

22. 請求の範囲20または21に記載のプラスミドで形質転換されてなる形質転換体。

23. 請求の範囲20に記載のプラスミドと、NADPH類を補酵素として機能する酵素遺伝子を含むプラスミドで同時に形質転換されてなる形質転換体。

24. 請求の範囲1乃至19のいずれかに記載の α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元酵素遺伝子の発現産物である α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質、または前記タンパク質を構成する1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質。

20

25. 配列番号20で示されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列質において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質。

25

26. 配列番号21で示されるアミノ酸配列または前記アミノ酸配列におい

て1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質。

- 5 27. 配列番号19に示される塩基配列のうち631番目の塩基より上流側の塩基配列から選択された塩基配列と、3543番目の塩基より下流側の塩基配列から選択された塩基配列とを相互に逆鎖の関係になるように組み合わせたプライマーを用いることを特徴とする α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の製造方法。

10

28. 配列番号19に示される塩基配列のうち631番目の塩基より上流側の塩基配列から選択された塩基配列と、2274番目の塩基より下流側の塩基配列から選択された塩基配列とを相互に逆鎖の関係になるように組み合わせたプライマーを用いることを特徴とする置換- α , β -不飽和カルボニル

- 15 化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の製造方法。

29. 配列番号19に示される塩基配列のうち2547番目の塩基より上流側の塩基配列から選択された塩基配列と、3543番目の塩基より下流側の塩基配列から選択された塩基配列とを相互に逆鎖の関係になるように組み合わせたプライマーを用いることを特徴とする α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物の還元活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の製造方法。

20

30. 請求の範囲22乃至23に記載の形質転換体培養物および／または処理物を用いることを特徴とする α -置換- α , β -不飽和カルボニル化合物

25 の還元方法。

図 1

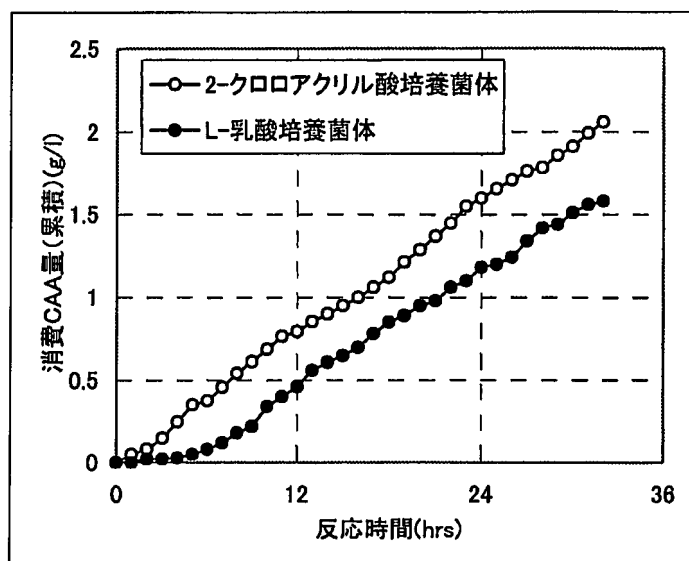


図 2

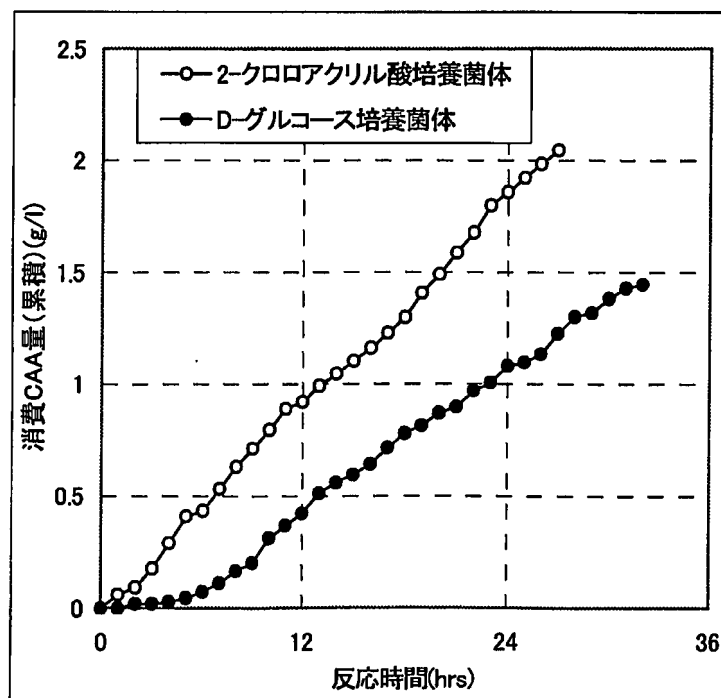


図 3

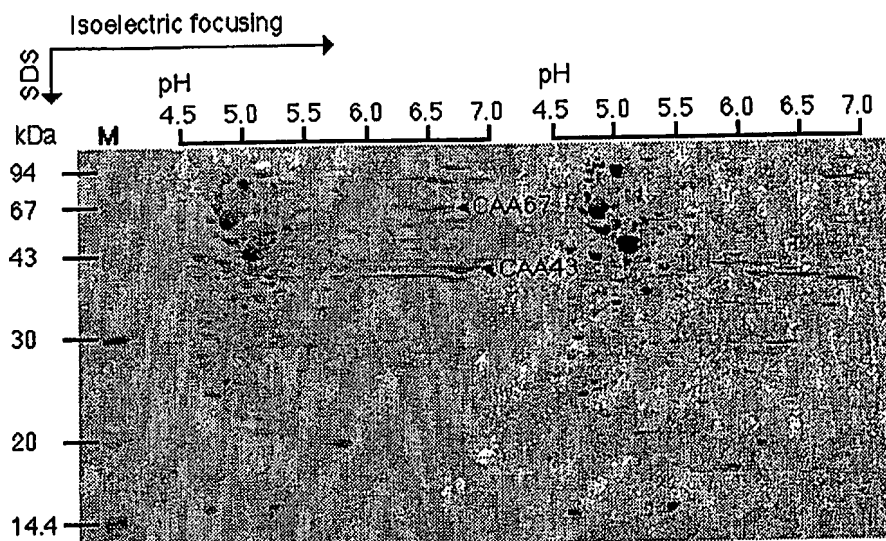


図 4

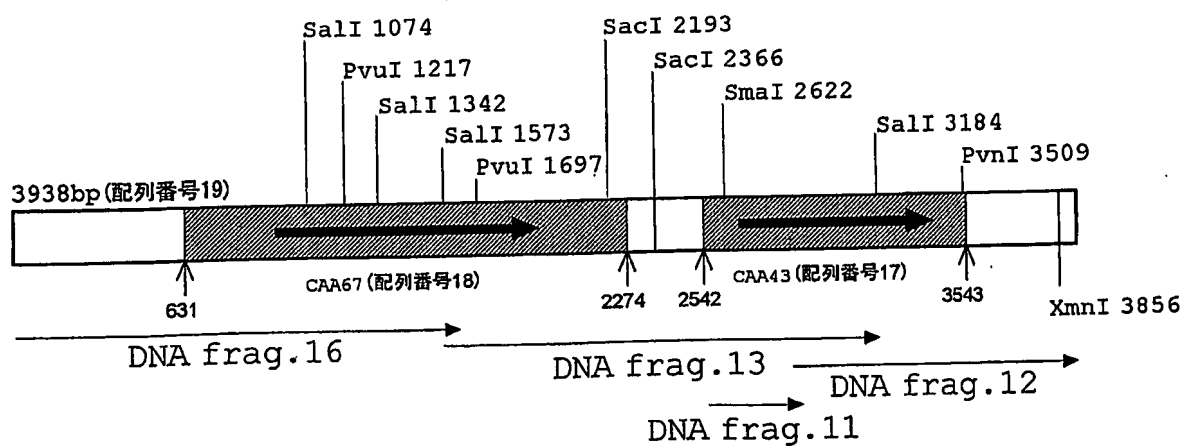
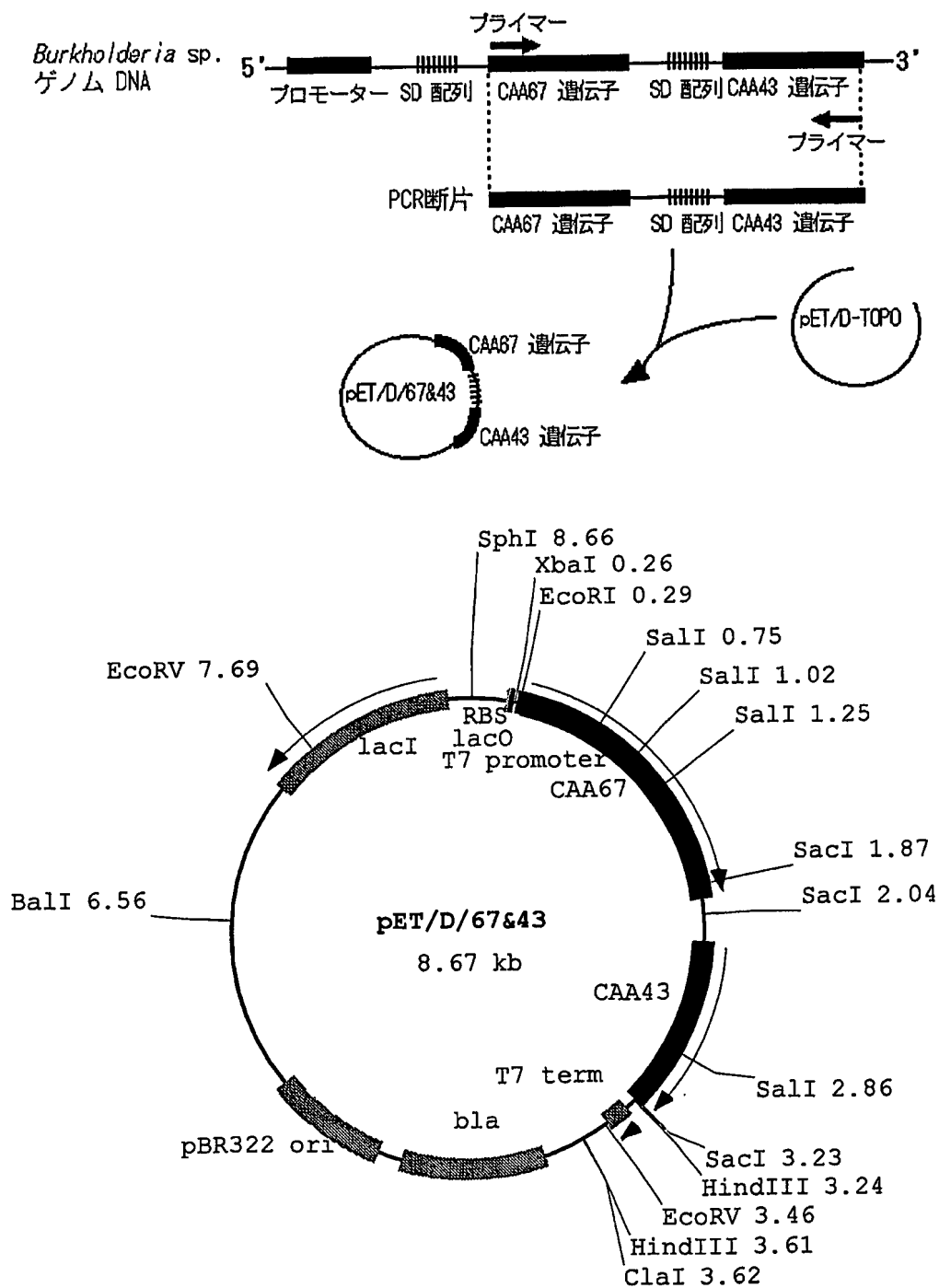


図 5



SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K. K.

<120> Fragment of Asymmetric-reduction Enzyme

<130> SDF-4489PCT

<150> JP2002-030127

<151> 2002-02-06

<150> JP2002-281236

<151> 2002-09-26

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Burkholderia sp.

<400> 1

Val Met Ala Ala Val Ile His Lys Lys Gly Gly Pro Asp Asn Phe Val
1 5 10 15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Burkholderia sp.

<400> 2

Asp Leu Asp Leu Asp Asp Val His Leu Ala Gly Leu Met Leu Lys
1 5 10 15

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Burkholderia sp.

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1).. (1)
<223> Unknown

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> Unknown

<400> 3

Xaa Asp Val Leu Val Thr Asp Val Leu Val Val Xaa Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> Burkholderia sp.

<400> 4

Val Phe Val Asp Phe Arg Glu Thr Lys Pro Glu Glu Trp Ala Pro Asp
1 5 10 15

Ser Leu Thr Gly Thr Phe Leu Gly Lys
20 25

<210> 5
<211> 30
<212> PRT

<213> Burkholderia sp.

<400> 5

Glu Leu Leu Ser Gly Leu Asp Ala Asp Tyr Gly Thr Arg Gly Ser Leu
1 5 10 15

Glu Asp Thr Thr Gly Leu Met Met Glu Phe Ser Ser Thr His
20 25 30

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Forward primer for N-terminal fragment of CAA43

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Inosine

<400> 6

atggcngcng tnathcayaa

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Reverse primer for N-terminal fragment of CAA43

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Inosine

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Inosine

<400> 7

ccngcnarrt gnacrtcgtc

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Forward primer for C-terminal fragment of CAA43

<400> 8

cgccccctcgg tgcctacagc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Reverse primer for C-terminal fragment of CAA43

<400> 9

ctaccccgcc gaaaaactga

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer for inverted PCR

<400> 10

ccgggcgagc caaccttaac

20

<210> 11

<211> 350

<212> DNA

<213> Burkholderia sp.

<400> 11

ggtaattcat aagaagggtg gaccgataa cttcgtatgg gaggaagta aggttggtc 60

gcccggcccg ggtcaagtgc gactgcgcaa tacggccatc ggggtaaact tcctggatac 120

ttatcaccgc gcaggcattc ctcaccgct ggctgttggc gagccgccga ttgtggtcgg 180

cttcgaagcc gccgctgtgg ttgaggaagt cggccccgt gtaaccgact tcaccgttgg 240

tgagcgggtc tgcacttgtc ttccgccct cggtcctac agccaggagc gcctctaccc 300

cgccgaaaaa ctgatcaagg ttccaaagga cctggatctt gatgacgtgc 350

<210> 12
 <211> 1069
 <212> DNA
 <213> Burkholderia sp.

<400> 12
 tcaaggttcc aaaggacctg gatcttgatg acgtgcacct cgcgggattg atgctcaagg 60
 ggatgacagc acaatatctg ctgcatcaga cgcacaaggt aaagccgggt gactacgtgt 120
 tgattcacgc ggcggtctggc ggcatgggcc acatcatggt tccttgggcg cgccacctcg 180
 gcgctaccgt gatcgggacg gtcagcacgg aagaaaagc tgagactgct cgcaaacctg 240
 gctgccacca taccatcaat tattccactc aggatttcgc tgaggtagtt cgcgaaatca 300
 cgggcgggaa ggggtgtcgc gtggtctacg attccatcgg taaagacaca ctccagaagt 360
 cgctcgactg tctgcgccg cgcggtatgt gtgcggccta cgggcacgca tccggcgtgg 420
 cagatccgat cagggtcgtc gaggacctcg gtgtacgtgg atcgctgttc attactagac 480
 ccgcactctg gcattacatg tcgaaccgca gtgagattga cgaagggtcg aagtgcctgt 540
 tcgatgccgt caaggcgggt gtactccata gcagtgtcgc aaagaccttc cctctgcggg 600
 aggcagcggc ggcgcacaaa tacatgggtg gtcgtcagac gatcggctcg attgttttgc 660
 ttccgcaagc gtaggtagcc gtagggcgtc accccggaat ttcggggtga ccgaaaacgt 720
 cgccgtgaac gcctatctgc ggatgttggc ggttgggtgg cattattttt cggcagcccg 780
 tcgttcgctg ccggctcgta cgttgccggt ttggacagtt cgtcaacggg gcgattgtga 840
 tttccaacct gcgacctcg attgggtcaa cgtgtgtttg actttctgtg aactctgtct 900

aagtacacga gaggtgtgta gatcagacgc gtgccgaagc tactcggatg ttccctgtcg 960
aggaattga aagagtcaat acacatgaac gtattcaata gagagatagt gctttccgtc 1020
cggcactgga cggataaact tttcagcttt accgcaacc gtaacgccg 1069

<210> 13
<211> 1617
<212> DNA
<213> Burkholderia sp.

<400> 13
gtcgacttcc gcgaaacgaa accggaggaa tgggcgcctg attcactcac aggcaccttc 60
ttgggcaagt gtgtcccga tttcatgacc accccggtac aggttgccgc gtcacgcac 120
tacacgatcg gcggtctgaa agtcgatgtg gatggccgta ccaatcttcc gaagctctac 180
gtgtcggcg agttggccgg tggcgtgcat ggcccaacc gccacggtgg cacggcgtg 240
gtcgatgcca tgacgtacgg ccggttgct ggacggcacg cggcgggaag cctcaacggc 300
gcggctgcga cgggaggtgc agcgcttcta cccgcaggca gcaaagcggg aaaggcaagc 360
cggattgagg gcgcaatgag cgatctgcgc cgcgcaaacc agctcgctct tggctctatt 420
cgtgatgccg tacggcttca acgcgttggg gagctgtttg ctgaactctt ggacgaggtc 480
cgctcgttcg gttggaacgg ctacaaggaa atgcaggaaa tcttgccgt cgagcgtgcg 540
atcaagctgt ctgacgtat gcgccaggcc atgttacgcc gcacggagac acgcggagtc 600
cactatcggg ccgatttccc gagtccagt gatgcatggt tgaagaagca ggtatttgca 660
ttgcgcgatg gggcgttgca ttcaaagac gttcccctct aatcaaagtc gcataagcgc 720

gatattgcat caggatatttg tctcgctgtg gtgtcatttg tgcctcggcg cccaagggtg 780
agagcgggaag gtggagctcg ccgccgaggc cagatctggt gtgtgtcgtt gttccgtatc 840
ggtagcaaaa acaatctgac ttcgctagcg ggcaggtaag ccgacggcgt atgctcgccg 900
aaggttcttg aattgagttc gtggtgacca tgcgctgctg gtgtgaatcg ctatttagga 960
gactttatca tggtaatggc agcggtaatt cataagaagg gtggaccgca taacttcgta 1020
tgggaggaag ttaaggttgg ctgcccggc ccgggtcaag tgcgactgcg caatacggcc 1080
atcggggtaa acttcctgga tacttatcac cgcgaggca ttcctaccc gctggtcgtt 1140
ggcgagccgc cgattgtggt cggcttcgaa gccgccgctg tggttgagga agtcgggtccc 1200
ggtgtaaccg acttcaccgt tggtagcgg gtctgcactt gtcttcgcc cctcggtgcc 1260
tacagccagg agcgcctcta ccccgccgaa aaactgatca aggttccaaa ggacctggat 1320
cttgatgacg tgcacctcgc gggattgatg ctcaagggga tgacagcaca atatctgctg 1380
catcagacgc acaaggtaaa gccgggtgac tacgtgttga ttcacgcggc ggctggcggc 1440
atgggccaca tcatggttcc ttgggcgcgc cacctcggcg ctaccgtgat cgggacggtc 1500
agcacggaag aaaaggctga gactgctcgc aaactcggct gccaccatac catcaattat 1560
tccactcagg atttcgctga ggtagttcgc gaaatcacgg gcgggaaggg tgctcgac 1617

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Forward primer for N-terminal fragment of CAA67

<400> 14
 catgaaattc gggacacact 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Reverse primer for N-terminal fragment of CAA67

<400> 15
 agaaggtgcc tgtgagtga 20

<210> 16
 <211> 1640
 <212> DNA
 <213> Burkholderia sp.

<400> 16
 aagcgtactc cagcgttagc tggccaatcc ttgcgtggag caccgtgacg tccactgggtg 60
 gctcaaacgt cgttgacttg cctgtctcga acacttccga cagcgcgtcc tgcaactgct 120
 tcttccagtc tgtaatctgg ttcggatgaa cgtcgcactg ctgcgccagt tctgccagcg 180
 tcttgtcgcc cctcggggct gccagcccta tctttgcctt gaataccgtg ctatgcgacc 240
 ggccggttct tttgtcatcg ttgggtcct cttgccggtc cttataccag ttcagttccc 300
 ggccgttcga cttaccgacc tgctgaatt tccggccgca cctctaacc aagatcattt 360
 ctgacgattt ggtagaagtt ttctgcgttc aggccacttt ttcggccgct ttccgagggg 420
 atagtattgc gacaaatgtg agcgatccgt agccaacggg tattgcgagg cggctgccgc 480

ttcggcgggt cacacctatc ctgtgtggtc gcacacaagg ttcgcgacgt caataaagat 540
gatttgaga catgcacgtg atgttctccc ttgatgtcta gcggtcgttg aggatcattt 600
aatccaatgt ttgacaggag gaggatgttc atgtcggatg ttcttgtaac agacgtgttg 660
gtggtgggcg agggctgcgc aggccaaacc gctgcgctta ctgcaagcga gtcgggttgt 720
gacgtcatca tgcttgaga cggccgcgca ccgagcaccg ctgtttccac cggcttcctt 780
acttatgccg cgcacgaagg tttcaatcgt gcccagctct acgaagcgat gtcacagacc 840
acaggcaagg gcttgtgtga tgtagcgctc ttgaggcgac ttgtcgatga agctccgaaa 900
gaaatggcgg agttgattga gacatataag gttcctgtcg ataaccgga gcgtggagtg 960
aggcgcgccc gggcagtggg taagagcgga aaagagcttc tctccggatt ggacgcggat 1020
tacgggacgc gtggttcctt cgaggacacg acgggcctaa tgatggagt ctcgtcgaca 1080
cacggaacag cgctctatgc ccagttgcgt aaagccgtga acacggcgcc aaagattcgg 1140
cgcgtacgcg gaagtgcgct ggttctcgaa cccggttcca ccacggtcgg tgcgcttgtc 1200
gatggcgagc cggtgacgat cgcggctcgt tcgatcatct tggcgactgg agggattcag 1260
ggcctctacg aggtcacgga taaccgcat acgctcacgg gtgatggtca tggcatggcg 1320
atggacgctg gcgcggagt cgtcgacatg gagttcatgc agttctaccc gctttcagtc 1380
aatgaggagg gcgcaccgac actcttcttc tatccggatt tcccaggcg cgccaagctc 1440
attgacgacg ggggccgaaa cgtcctgggtg aagcatctcg gcgagggtc gcaatacctt 1500
tcggagttgc ataattggga tcagctagcc gcggtggtac agacggagat tgtcgaaggc 1560
aggaaggtat ttgtcgactt ccgcgaaacg aaaccggagg aatgggcgcc tgattcactc 1620

acaggcacct tcttgggcaa

1640

<210> 17

<211> 1002

<212> DNA

<213> Burkholderia sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1002)

<223>

<400> 17

atg gta atg gca gcg gta att cat aag aag ggt gga ccc gat aac ttc	48
Met Val Met Ala Ala Val Ile His Lys Lys Gly Gly Pro Asp Asn Phe	
1 5 10 15	

gta tgg gag gaa gtt aag gtt ggc tcg ccc ggc ccg ggt caa gtg cga	96
Val Trp Glu Glu Val Lys Val Gly Ser Pro Gly Pro Gly Gln Val Arg	
20 25 30	

ctg cgc aat acg gcc atc ggg gta aac ttc ctg gat act tat cac cgc	144
Leu Arg Asn Thr Ala Ile Gly Val Asn Phe Leu Asp Thr Tyr His Arg	
35 40 45	

gca ggc att cct cac ccg ctg gtc gtt ggc gag ccg ccg att gtg gtc	192
Ala Gly Ile Pro His Pro Leu Val Val Gly Glu Pro Pro Ile Val Val	
50 55 60	

ggc ttc gaa gcc gcc gct gtg gtt gag gaa gtc ggt ccc ggt gta acc	240
Gly Phe Glu Ala Ala Ala Val Val Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr	
65 70 75 80	

gac ttc acc gtt ggt gag cgg gtc tgc act tgt ctt ccg ccc ctc ggt	288
Asp Phe Thr Val Gly Glu Arg Val Cys Thr Cys Leu Pro Pro Leu Gly	
85 90 95	

gcc tac agc cag gag cgc ctc tac ccc gcc gaa aaa ctg atc aag gtt	336
Ala Tyr Ser Gln Glu Arg Leu Tyr Pro Ala Glu Lys Leu Ile Lys Val	
100 105 110	
cca aag gac ctg gat ctt gat gac gtg cac ctc gcg gga ttg atg ctc	384
Pro Lys Asp Leu Asp Leu Asp Asp Val His Leu Ala Gly Leu Met Leu	
115 120 125	
aag ggg atg aca gca caa tat ctg ctg cat cag acg cac aag gta aag	432
Lys Gly Met Thr Ala Gln Tyr Leu Leu His Gln Thr His Lys Val Lys	
130 135 140	
ccg ggt gac tac gtg ttg att cac gcg gcg gct ggc ggc atg ggc cac	480
Pro Gly Asp Tyr Val Leu Ile His Ala Ala Ala Gly Gly Met Gly His	
145 150 155 160	
atc atg gtt cct tgg gcg cgc cac ctc ggc gct acc gtg atc ggg acg	528
Ile Met Val Pro Trp Ala Arg His Leu Gly Ala Thr Val Ile Gly Thr	
165 170 175	
gtc agc acg gaa gaa aag gct gag act gct cgc aaa ctc ggc tgc cac	576
Val Ser Thr Glu Glu Lys Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Cys His	
180 185 190	
cat acc atc aat tat tcc act cag gat ttc gct gag gta gtt cgc gaa	624
His Thr Ile Asn Tyr Ser Thr Gln Asp Phe Ala Glu Val Val Arg Glu	
195 200 205	
atc acg ggc ggg aag ggt gtc gac gtg gtc tac gat tcc atc ggt aaa	672
Ile Thr Gly Gly Lys Gly Val Asp Val Val Tyr Asp Ser Ile Gly Lys	
210 215 220	
gac aca ctc cag aag tcg ctc gac tgt ctg cgg ccg cgc ggt atg tgt	720
Asp Thr Leu Gln Lys Ser Leu Asp Cys Leu Arg Pro Arg Gly Met Cys	
225 230 235 240	

gcg gcc tac ggg cac gca tcc ggc gtg gca gat ccg atc agg gtc gtc 768
 Ala Ala Tyr Gly His Ala Ser Gly Val Ala Asp Pro Ile Arg Val Val
 245 250 255

gag gac ctc ggt gta cgt gga tcg ctg ttc att act aga ccc gca ctc 816
 Glu Asp Leu Gly Val Arg Gly Ser Leu Phe Ile Thr Arg Pro Ala Leu
 260 265 270

tgg cat tac atg tcg aac cgc agt gag att gac gaa ggg tcg aag tgc 864
 Trp His Tyr Met Ser Asn Arg Ser Glu Ile Asp Glu Gly Ser Lys Cys
 275 280 285

ctg ttc gat gcc gtc aag gcg ggt gta ctc cat agc agt gtc gca aag 912
 Leu Phe Asp Ala Val Lys Ala Gly Val Leu His Ser Ser Val Ala Lys
 290 295 300

acc ttc cct ctg cgg gag gca gcg gcg gcg cac aaa tac atg ggt ggt 960
 Thr Phe Pro Leu Arg Glu Ala Ala Ala Ala His Lys Tyr Met Gly Gly
 305 310 315 320

cgt cag acg atc ggc tcg att gtt ttg ctt ccg caa gcg tag 1002
 Arg Gln Thr Ile Gly Ser Ile Val Leu Leu Pro Gln Ala
 325 330

<210> 18

<211> 1644

<212> DNA

<213> Burkholderia sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1644)

<223>

<400> 18

atg tcg gat gtt ctt gta aca gac gtg ttg gtg gtg ggc gag ggc tgc 48
 Met Ser Asp Val Leu Val Thr Asp Val Leu Val Val Gly Glu Gly Cys

1	5	10	15	
gca ggc caa acc gct gcg ctt act gca agc gag tcg ggt tgt gac gtc				96
Ala Gly Gln Thr Ala Ala Leu Thr Ala Ser Glu Ser Gly Cys Asp Val				
	20	25	30	
atc atg ctt gga gac ggc cgc gca ccg agc acc gct gtt tcc acc ggc				144
Ile Met Leu Gly Asp Gly Arg Ala Pro Ser Thr Ala Val Ser Thr Gly				
	35	40	45	
ttc ctt act tat gcc gcg cac gaa ggt ttc aat cgt gcc cag ctc tac				192
Phe Leu Thr Tyr Ala Ala His Glu Gly Phe Asn Arg Ala Gln Leu Tyr				
	50	55	60	
gaa gcg atg tca cag acc aca ggc aag ggc ttg tgt gat gta gcg ctc				240
Glu Ala Met Ser Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Cys Asp Val Ala Leu				
	65	70	75	80
ttg agg cga ctt gtc gat gaa gct ccg aaa gaa atg gcg gag ttg att				288
Leu Arg Arg Leu Val Asp Glu Ala Pro Lys Glu Met Ala Glu Leu Ile				
	85	90	95	
gag aca tat aag gtt cct gtc gat aac acc gag cgt gga gtg agg gcg				336
Glu Thr Tyr Lys Val Pro Val Asp Asn Thr Glu Arg Gly Val Arg Ala				
	100	105	110	
cgc cgg gca gtg ggt aag agc gga aaa gag ctt ctc tcc gga ttg gac				384
Arg Arg Ala Val Gly Lys Ser Gly Lys Glu Leu Leu Ser Gly Leu Asp				
	115	120	125	
gcg gat tac ggg acg cgt ggt tcc ctc gag gac acg acg ggc cta atg				432
Ala Asp Tyr Gly Thr Arg Gly Ser Leu Glu Asp Thr Thr Gly Leu Met				
	130	135	140	
atg gag ttc tcg tcg aca cac gga aca gcg ctc tat gcc cag ttg cgt				480
Met Glu Phe Ser Ser Thr His Gly Thr Ala Leu Tyr Ala Gln Leu Arg				
	145	150	155	160

aaa gcc gtg aac acg gcg cca aag att cgg cgc gta cgc gga agt gcg	528
Lys Ala Val Asn Thr Ala Pro Lys Ile Arg Arg Val Arg Gly Ser Ala	
165 170 175	
ctg gtt ctc gaa ccc ggt tcc acc acg gtc ggt gcg ctt gtc gat ggc	576
Leu Val Leu Glu Pro Gly Ser Thr Thr Val Gly Ala Leu Val Asp Gly	
180 185 190	
gag ccg gtg acg atc gcg gct cgt tcc atc atc ttg gcg act gga ggg	624
Glu Pro Val Thr Ile Ala Ala Arg Ser Ile Ile Leu Ala Thr Gly Gly	
195 200 205	
att cag ggc ctc tac gag gtc acg gat aac ccg cat acg ctc acg ggt	672
Ile Gln Gly Leu Tyr Glu Val Thr Asp Asn Pro His Thr Leu Thr Gly	
210 215 220	
gat ggt cat ggc atg gcg atg gac gct ggc gcg gag ttc gtc gac atg	720
Asp Gly His Gly Met Ala Met Asp Ala Gly Ala Glu Phe Val Asp Met	
225 230 235 240	
gag ttc atg cag ttc tac ccg ctt tca gtc aat gag gag ggc gca ccg	768
Glu Phe Met Gln Phe Tyr Pro Leu Ser Val Asn Glu Glu Gly Ala Pro	
245 250 255	
aca ctc ttc ttc tat ccg gat ttc ccc agg cgc gcc aag ctc att gac	816
Thr Leu Phe Phe Tyr Pro Asp Phe Pro Arg Arg Ala Lys Leu Ile Asp	
260 265 270	
gac ggg ggc cga aac gtc ctg gtg aag cat ctc ggc gag ggc tcg caa	864
Asp Gly Gly Arg Asn Val Leu Val Lys His Leu Gly Glu Gly Ser Gln	
275 280 285	
tac ctt tcc gag ttg cat aat tgg gat cag cta gcc gcg gtg gta cag	912
Tyr Leu Ser Glu Leu His Asn Trp Asp Gln Leu Ala Ala Val Val Gln	
290 295 300	

acg gag att gtc gaa ggc agg aag gta ttt gtc gac ttc cgc gaa acg	960
Thr Glu Ile Val Glu Gly Arg Lys Val Phe Val Asp Phe Arg Glu Thr	
305 310 315 320	
aaa ccg gag gaa tgg gcg cct gat tca ctc aca ggc acc ttc ttg ggc	1008
Lys Pro Glu Glu Trp Ala Pro Asp Ser Leu Thr Gly Thr Phe Leu Gly	
325 330 335	
aag tgt gtc ccg aat ttc atg acc acc ccg gta cag gtt gcg ccg tca	1056
Lys Cys Val Pro Asn Phe Met Thr Thr Pro Val Gln Val Ala Pro Ser	
340 345 350	
tcg cac tac acg atc ggc ggt ctg aaa gtc gat gtg gat ggc cgt acc	1104
Ser His Tyr Thr Ile Gly Gly Leu Lys Val Asp Val Asp Gly Arg Thr	
355 360 365	
aat ctt ccg aag ctc tac gct gtc ggc gag ttg gcc ggt ggc gtg cat	1152
Asn Leu Pro Lys Leu Tyr Ala Val Gly Glu Leu Ala Gly Gly Val His	
370 375 380	
ggc gcc aac cgc cac ggt ggc acg gcg ctg gtc gat gcc atg acg tac	1200
Gly Ala Asn Arg His Gly Gly Thr Ala Leu Val Asp Ala Met Thr Tyr	
385 390 395 400	
ggc cgg att gct gga cgg cac gcg gcg gga agc ctc aac ggc gcg gct	1248
Gly Arg Ile Ala Gly Arg His Ala Ala Gly Ser Leu Asn Gly Ala Ala	
405 410 415	
gcg acg gga ggt gca gcg ctt cta ccc gca ggc agc aaa gcg gga aag	1296
Ala Thr Gly Gly Ala Ala Leu Leu Pro Ala Gly Ser Lys Ala Gly Lys	
420 425 430	
gca agc cgg att gag ggc gca atg agc gat ctg cgc cgc gca aac cag	1344
Ala Ser Arg Ile Glu Gly Ala Met Ser Asp Leu Arg Arg Ala Asn Gln	
435 440 445	
ctc gct ctt ggt cct att cgt gat gcc gta cgg ctt caa cgc gtt ggg	1392

Leu Ala Leu Gly Pro Ile Arg Asp Ala Val Arg Leu Gln Arg Val Gly
 450 455 460

 gag ctg ttt gct gaa ctc ttg gac gag gtc cgc tcg ttc ggt tgg aac 1440
 Glu Leu Phe Ala Glu Leu Leu Asp Glu Val Arg Ser Phe Gly Trp Asn
 465 470 475 480

 ggc tac aag gaa atg cag gaa atc ttg cgc gtc gag cgt gcg atc aag 1488
 Gly Tyr Lys Glu Met Gln Glu Ile Leu Arg Val Glu Arg Ala Ile Lys
 485 490 495

 ctg tct gac gct atg cgc cag gcc atg tta cgc cgc acg gag aca cgc 1536
 Leu Ser Asp Ala Met Arg Gln Ala Met Leu Arg Arg Thr Glu Thr Arg
 500 505 510

 gga gtc cac tat cgg gcc gat ttc ccg agc tcc agt gat gca tgg ttg 1584
 Gly Val His Tyr Arg Ala Asp Phe Pro Ser Ser Ser Asp Ala Trp Leu
 515 520 525

 aag aag cag gta ttt gca ttg cgc gat ggg gcg ttg cat ttc aaa gac 1632
 Lys Lys Gln Val Phe Ala Leu Arg Asp Gly Ala Leu His Phe Lys Asp
 530 535 540

 gtt ccc ctc taa 1644
 Val Pro Leu
 545

<210> 19

<211> 3938

<212> DNA

<213> Burkholderia sp.

<400> 19

aagcgtagc cagcgtagc tggccaatcc ttgcgtggag caccgtgacg tccactggtg 60

gctcaaacgt cgttgacttg cctgtctcga acacttccga cagcgctcc tgcaactgct 120

tcttccagtc tgtaatctgg ttcggatgaa cgtcgcactg ctgcgccagt tctgccagcg 180

tcttgtcgcc cctcggggct gccagcccta tctttgcctt gaataccgtg ctatgcgacc 240

ggcggcttct tttgtcatcg ttgggctcct cttgccggtc cttataaccag ttcagttccc 300

ggccgttcga cttaccgacc tgcctgaatt tccggccgca cctctaacc aagatcattt 360

ctgacgattt ggtagaagtt ttctgcgttc aggccacttt ttcggccgct ttccgagggg 420

atagtattgc gacaaatgtg agcgatccgt agccaacggg tattgcgagg cggctgccgc 480

ttcggcgggt cacacctatc ctgtgtggtc gcacacaagg ttcgcgacgt caataaagat 540

gatttgaga catgcacgtg atgttctccc ttgatgtcta gcggtcgttg aggatcattt 600

aatccaatgt ttgacaggag gaggatgttc atgtcggatg ttcttgtaac agacgtgttg 660

gtggtgggcg agggctgcgc aggccaaacc gctgcgctta ctgcaagcga gtcgggttgt 720

gacgtcatca tgcttgaga cggccgcgca ccgagcacg ctgtttccac cggttccctt 780

acttatgccg cgcacgaagg tttcaatcgt gccagctct acgaagcgat gtcacagacc 840

acaggcaagg gcttgtgtga tgtagcgtc ttgaggcgac ttgtcgatga agtccgaaa 900

gaaatggcgg agttgattga gacatataag gtccctgtcg ataacaccga gcgtggagt 960

aggcgcgcc gggcagtggt taagagcgga aaagagcttc tctccggatt ggacgcggat 1020

tacgggacgc gtggttccct cgaggacacg acgggcctaa tgatggagt ctcgtcgaca 1080

cacggaacag cgctctatgc ccagttgcgt aaagccgtga acacggcgcc aaagattcgg 1140

cgcgtacgcg gaagtgcgt ggttctcgaa cccggttcca ccacggtcgg tgcgttgtc 1200

gatggcgagc cggtagcatg cgcggctcgt tcgatcatct tggcgactgg agggattcag 1260

ggcctctacg aggtcacgga taaccgcgat acgtcacgg gtgatggta tggcatggcg 1320
atggacgtg gcgcggagtt cgtcgacatg gagttcatgc agttctaccc gctttcagtc 1380
aatgaggagg gcgcaccgac actcttcttc tatccggatt tcccaggcg cgccaagctc 1440
attgacgacg ggggccgaaa cgtcctggtg aagcatctcg gcgagggtc gcaatacctt 1500
tcggagttgc ataattggga tcagctagcc gcggtggtag agacggagat tgtcgaaggc 1560
aggaaggtat ttgtcgactt ccgcgaaacg aaaccggagg aatgggcgc tgattcactc 1620
acaggcacct tcttgggcaa gtgtgtcccg aatttcatga ccaccccggt acaggttgcg 1680
ccgtcatcgc actacacgat cggcggctcg aaagtcgatg tggatggccg taccaatctt 1740
ccgaagctct acgtgtcgg cgagttggcc ggtggcgtgc atggcgcaa ccgccacggt 1800
ggcacggcgc tggtcgatgc catgacgtac ggccggattg ctggacggca cgcggcggga 1860
agcctcaacg gcgcggctgc gacgggaggt gcagcgcttc taccgcagg cagcaaagcg 1920
ggaaaggcaa gccggattga gggcgcaatg agcgatctgc gccgcgcaa ccagctcgct 1980
cttggctcta ttcgtgatgc cgtacggctt caacgcgttg gggagctgtt tgctgaactc 2040
ttggacgagg tccgctcgtt cggttggaac ggctacaagg aaatgcagga aatcttgcgc 2100
gtcgagcgtg cgatcaagct gtctgacgct atgcgccagg ccatgttacg ccgcacggag 2160
acacgcggag tccactatcg ggccgatttc ccgagctcca gtgatgatg gttgaagaag 2220
caggtatttg cattgcgcga tggggcgttg catttcaaag acgttcccct ctaatcaaag 2280
tcgcataagc gcgatattgc atcaggtatt tgtctcgtg tgggtgcatt tgtgcctcgg 2340

cgcccaaggg tgagagcgga aggtggagct cgccgccgcg ggcagatctg gtgtgtgtcg 2400

ttgttccgta tcggtagcaa aaacaatctg acttcgctag cgggcaggta agccgacggc 2460

gatatctcgc cgaaggttct tgaattgagt tcgtggtgac catgtcgtcg cgggtgtgaat 2520

cgctatttag gagactttat catggtaatg gcagcggtaa ttcataagaa ggggtggaccc 2580

gataacttcg tatgggagga agttaagggt ggctcgcccg gcccggtca agtcgactg 2640

cgcaatacgg ccatcggggt aaacttcctg gatacttata accgcgcagg cattcctcac 2700

ccgctggctg ttggcgagcc gccgattgtg gtcggcttcg aagccgccgc tgtggttag 2760

gaagtcggtc ccggtgtaac cgacttcacc gttggtgagc gggctctgcac ttgtcttccg 2820

cccctcgtg cctacagcca ggagcgctc taccgcccg aaaaactgat caaggttcca 2880

aaggacctgg atcttgatga cgtgcacctc gcgggattga tgctcaaggg gatgacagca 2940

caatatctgc tgcacagac gcacaaggta aagccgggtg actacgtgtt gattcacgcg 3000

gcggctggcg gcatgggcca catcatggtt ccttgggcgc gccacctcg cgctaccgtg 3060

atcgggacgg tcagcacgga agaaaaggct gagactgctc gcaaactcgg ctgccacat 3120

accatcaatt attccactca ggatttcgct gaggtagtgc gcgaaatcac gggcgggaag 3180

gggtgcgacg tggctctacga ttccatcgtt aaagacacac tccagaagtc gctcgactgt 3240

ctgcggccgc gcggtatgtg tgcggcctac gggcacgcat ccggcgtggc agatccgatc 3300

agggtcgtcg aggacctcgg tgtacgtgga tcgctgttca ttactagacc cgcactctgg 3360

cattacatgt cgaaccgcag tgagattgac gaagggtcga agtgcctgtt cgatgccgtc 3420

aaggcgggtg tactccatag cagtgtcgca aagaccttc ctctgcggga ggcagcggcg 3480

gcgcacaaat acatgggtgg tcgtcagacg atcggctcga ttgttttgct tccgcaagcg 3540
 taggtagccg tagggcgta ccccggaatt tcggggtgac cgaaaacgac gccgtgaacg 3600
 cctatctgcg gatgttgcg gttgggtggc attatttttc ggcagcccg cgttcgtgc 3660
 cggctcgtac gttccggtt tggacagttc gtcaacgggg cgatttgtat ttccaaccg 3720
 cgaccctcga ttgggtcaac gtgtgtttga ctttctgtga actctgtcta agtacacgag 3780
 aggtgtgtag atcagacgcg tgcogaagct actcggatgt tccctgtcga ggcaattgaa 3840
 agagtcaata cacatgaacg tattcaatag agagatagtg ctttccgtcc ggcactggac 3900
 ggataaactt ttcagcttta ccgcaaccog taacgccg 3938

<210> 20

<211> 333

<212> PRT

<213> Burkholderia sp.

<400> 20

Met Val Met Ala Ala Val Ile His Lys Lys Gly Gly Pro Asp Asn Phe
 1 5 10 15

Val Trp Glu Glu Val Lys Val Gly Ser Pro Gly Pro Gly Gln Val Arg
 20 25 30

Leu Arg Asn Thr Ala Ile Gly Val Asn Phe Leu Asp Thr Tyr His Arg
 35 40 45

Ala Gly Ile Pro His Pro Leu Val Val Gly Glu Pro Pro Ile Val Val
 50 55 60

Gly Phe Glu Ala Ala Ala Val Val Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr

65 70 75 80
Asp Phe Thr Val Gly Glu Arg Val Cys Thr Cys Leu Pro Pro Leu Gly
 85 90 95
Ala Tyr Ser Gln Glu Arg Leu Tyr Pro Ala Glu Lys Leu Ile Lys Val
 100 105 110
Pro Lys Asp Leu Asp Leu Asp Asp Val His Leu Ala Gly Leu Met Leu
 115 120 125
Lys Gly Met Thr Ala Gln Tyr Leu Leu His Gln Thr His Lys Val Lys
 130 135 140
Pro Gly Asp Tyr Val Leu Ile His Ala Ala Ala Gly Gly Met Gly His
145 150 155 160
Ile Met Val Pro Trp Ala Arg His Leu Gly Ala Thr Val Ile Gly Thr
 165 170 175
Val Ser Thr Glu Glu Lys Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Cys His
 180 185 190
His Thr Ile Asn Tyr Ser Thr Gln Asp Phe Ala Glu Val Val Arg Glu
 195 200 205
Ile Thr Gly Gly Lys Gly Val Asp Val Val Tyr Asp Ser Ile Gly Lys
 210 215 220
Asp Thr Leu Gln Lys Ser Leu Asp Cys Leu Arg Pro Arg Gly Met Cys
225 230 235 240
Ala Ala Tyr Gly His Ala Ser Gly Val Ala Asp Pro Ile Arg Val Val
 245 250 255
Glu Asp Leu Gly Val Arg Gly Ser Leu Phe Ile Thr Arg Pro Ala Leu
 260 265 270

Trp His Tyr Met Ser Asn Arg Ser Glu Ile Asp Glu Gly Ser Lys Cys
 275 280 285

Leu Phe Asp Ala Val Lys Ala Gly Val Leu His Ser Ser Val Ala Lys
 290 295 300

Thr Phe Pro Leu Arg Glu Ala Ala Ala Ala His Lys Tyr Met Gly Gly
 305 310 315 320

Arg Gln Thr Ile Gly Ser Ile Val Leu Leu Pro Gln Ala
 325 330

<210> 21

<211> 547

<212> PRT

<213> Burkholderia sp.

<400> 21

Met Ser Asp Val Leu Val Thr Asp Val Leu Val Val Gly Glu Gly Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Gln Thr Ala Ala Leu Thr Ala Ser Glu Ser Gly Cys Asp Val
 20 25 30

Ile Met Leu Gly Asp Gly Arg Ala Pro Ser Thr Ala Val Ser Thr Gly
 35 40 45

Phe Leu Thr Tyr Ala Ala His Glu Gly Phe Asn Arg Ala Gln Leu Tyr
 50 55 60

Glu Ala Met Ser Gln Thr Thr Gly Lys Gly Leu Cys Asp Val Ala Leu
 65 70 75 80

Leu Arg Arg Leu Val Asp Glu Ala Pro Lys Glu Met Ala Glu Leu Ile
 85 90 95

Glu Thr Tyr Lys Val Pro Val Asp Asn Thr Glu Arg Gly Val Arg Ala
100 105 110

Arg Arg Ala Val Gly Lys Ser Gly Lys Glu Leu Leu Ser Gly Leu Asp
115 120 125

Ala Asp Tyr Gly Thr Arg Gly Ser Leu Glu Asp Thr Thr Gly Leu Met
130 135 140

Met Glu Phe Ser Ser Thr His Gly Thr Ala Leu Tyr Ala Gln Leu Arg
145 150 155 160

Lys Ala Val Asn Thr Ala Pro Lys Ile Arg Arg Val Arg Gly Ser Ala
165 170 175

Leu Val Leu Glu Pro Gly Ser Thr Thr Val Gly Ala Leu Val Asp Gly
180 185 190

Glu Pro Val Thr Ile Ala Ala Arg Ser Ile Ile Leu Ala Thr Gly Gly
195 200 205

Ile Gln Gly Leu Tyr Glu Val Thr Asp Asn Pro His Thr Leu Thr Gly
210 215 220

Asp Gly His Gly Met Ala Met Asp Ala Gly Ala Glu Phe Val Asp Met
225 230 235 240

Glu Phe Met Gln Phe Tyr Pro Leu Ser Val Asn Glu Glu Gly Ala Pro
245 250 255

Thr Leu Phe Phe Tyr Pro Asp Phe Pro Arg Arg Ala Lys Leu Ile Asp
260 265 270

Asp Gly Gly Arg Asn Val Leu Val Lys His Leu Gly Glu Gly Ser Gln
275 280 285

Tyr Leu Ser Glu Leu His Asn Trp Asp Gln Leu Ala Ala Val Val Gln
 290 295 300

Thr Glu Ile Val Glu Gly Arg Lys Val Phe Val Asp Phe Arg Glu Thr
 305 310 315 320

Lys Pro Glu Glu Trp Ala Pro Asp Ser Leu Thr Gly Thr Phe Leu Gly
 325 330 335

Lys Cys Val Pro Asn Phe Met Thr Thr Pro Val Gln Val Ala Pro Ser
 340 345 350

Ser His Tyr Thr Ile Gly Gly Leu Lys Val Asp Val Asp Gly Arg Thr
 355 360 365

Asn Leu Pro Lys Leu Tyr Ala Val Gly Glu Leu Ala Gly Gly Val His
 370 375 380

Gly Ala Asn Arg His Gly Gly Thr Ala Leu Val Asp Ala Met Thr Tyr
 385 390 395 400

Gly Arg Ile Ala Gly Arg His Ala Ala Gly Ser Leu Asn Gly Ala Ala
 405 410 415

Ala Thr Gly Gly Ala Ala Leu Leu Pro Ala Gly Ser Lys Ala Gly Lys
 420 425 430

Ala Ser Arg Ile Glu Gly Ala Met Ser Asp Leu Arg Arg Ala Asn Gln
 435 440 445

Leu Ala Leu Gly Pro Ile Arg Asp Ala Val Arg Leu Gln Arg Val Gly
 450 455 460

Glu Leu Phe Ala Glu Leu Leu Asp Glu Val Arg Ser Phe Gly Trp Asn
 465 470 475 480

Gly Tyr Lys Glu Met Gln Glu Ile Leu Arg Val Glu Arg Ala Ile Lys

485 490 495
 Leu Ser Asp Ala Met Arg Gln Ala Met Leu Arg Arg Thr Glu Thr Arg
 500 505 510
 Gly Val His Tyr Arg Ala Asp Phe Pro Ser Ser Ser Asp Ala Trp Leu
 515 520 525
 Lys Lys Gln Val Phe Ala Leu Arg Asp Gly Ala Leu His Phe Lys Asp
 530 535 540

Val Pro Leu
 545

<210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Forward primer for Asymmetric reductase coding region

<400> 22
 caccatgtcg gatgttcttg taac 24

<210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Reverse primer for Asymmetric reductase coding region

<400> 23
 ctacgcttgc ggaagcaaa 19

第Ⅷ欄 (v) 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

申立ては実施細則第 215 号に規定する標準文書を使用して作成しなければならない。第Ⅷ欄と同欄(i)～(v)の備考の総論部分、及び本頁に特有の事項について第Ⅷ欄(v)の備考を参照。この欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v)及び 51 の 2.1(e)(v))

本国際出願に関し、

昭和電工株式会社は、本国際出願の請求項に記載された対象が
以下のように開示されたことを申し立てる。

(i) 開示の種類

(d) 学会発表資料

(ii) 開示の日付 2002年(平成14年)3月27日

(iii) 開示の名称

日本農芸化学会2002年度(平成14年度)大会

講演番号: 4-4Ca14

発表者および演題: 倉田淳志、栗原達夫、江崎信芳

「Burkholderia sp. WS の2-クロロアクリル酸代謝経路」

(iv) 開示の場所 東北学院大学教養学部泉キャンパス

(v) 本申立ては、すべての指定国のためになされたものである。



この申立ての続葉として「第Ⅷ欄(v)の続き」がある

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01240

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53 C12N9/02, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12P7/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53 C12N9/02, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12P7/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2000-106891 A1 (Showa Denko Kabushiki Kaisha), 18 April, 2000 (18.04.00), Full text & EP 979877 A2 & US 6379935 B1	1-30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 April, 2003 (11.04.03)

Date of mailing of the international search report
30 April, 2003 (30.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12P7/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/53, C12N9/02, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12P7/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-106891 A1 (昭和電工株式会社) 2000.04.18, 全文 & EP 979877 A2 & US 6379935 B1	1-30

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.04.03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448